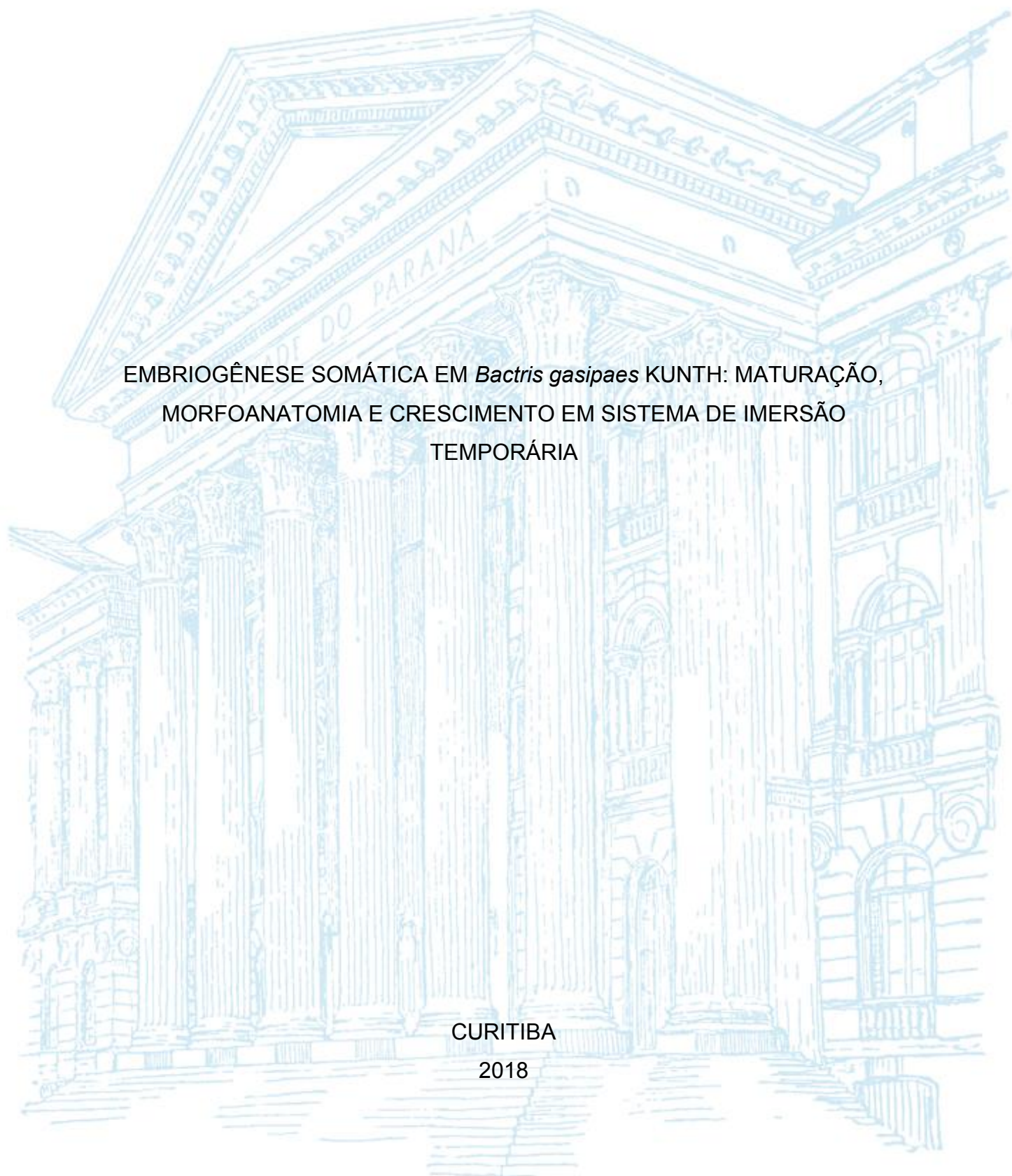


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO HENRIQUE DELFRATE PADILHA

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Bactris gasipaes* KUNTH: MATURAÇÃO,  
MORFOANATOMIA E CRESCIMENTO EM SISTEMA DE IMERSÃO  
TEMPORÁRIA

CURITIBA  
2018



JOÃO HENRIQUE DELFRATE PADILHA

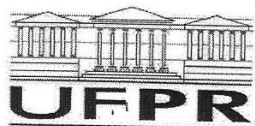
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Bactris gasipaes* KUNTH: MATURAÇÃO,  
MORFOANATOMIA E CRESCIMENTO EM SISTEMA DE IMERSÃO  
TEMPORÁRIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal-Agronomia, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Profª Drª. Marguerite Quoirin  
Co-orientador: Drº. Douglas Steinmacher

CURITIBA

2018



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA  
(PRODUÇÃO VEGETAL)

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JOÃO HENRIQUE DELFRATE PADILHA** intitulada: **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Bactris gasipaes* Kunth: MATURAÇÃO, MORFOANATOMIA E CRESCIMENTO EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Março de 2018.

MARGUERITE GERMAINE GHISLAINE QUOIRIN  
Presidente da Banca Examinadora

REGINA CAETANO QUISEN  
Avaliador Externo

CLEUSA BONA  
Avaliador Externo

DOUGLAS ANDRÉ STEINMACHER  
Avaliador Externo

CICERO DESCHAMPS  
Avaliador Interno

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR -  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, DOUGLAS ALEX JANKOSKI CRB 9/1167  
COM OS DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

P123e Padilha, João Henrique Delfrate  
Embriogênese somática em *Bactris gasipaes* Kunth:  
maturação, morfoanatomia e crescimento em sistema de imersão  
temporária / João Henrique Delfrate Padilha. - Curitiba, 2018.  
143 f.: il., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de  
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia –  
(Produção Vegetal).

Orientadora: Marguerite Quoirin  
Coorientador: Douglas Steinmacher

1. Pupunheira. 2. Embriogênese somática. 3. Palmeira. 4.  
metabólitos. I. Quoirin, Marguerite. II. Steinmacher, Douglas. III.  
Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDU 634.61

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais,  
Aos meus amigos,  
Aos meus guias e orixás**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha mãe, Luciângela Delfrate, pelo apoio e incentivo durante toda a minha vida e pela força durante esses anos de estudo.

Aos meus orientadores, professora Marguerite Quoirin e Drº Douglas Steinmacher pelo auxílio e oportunidades durante esses quatro anos; por acreditar em mim e sempre estarem dispostos a ajudar no que fosse preciso.

À Poliana Cardoso, sem a qual esse trabalho não seria entregue, pelas idéias e direcionamentos durante essa trajetória e apoio moral para que eu não desistisse.

Ao Dr. Fabrício Hansel, da EMBRAPA Florestas, pela ajuda nas análises pós extração dos metabólitos primários e discussão dos resultados.

À Tamires Melo, pela ajuda em todas as análises do capítulo 2, pelas caronas e pela paciência com os problemas que apareceram em todas as etapas do processo.

À Drª Cristiane Helm, da EMBRAPA Florestas, por aceitar minha entrada em seu laboratório e permitir que realizasse todas as análises do capítulo 2.

Aos meus amigos que ajudaram em alguma parte do processo de confecção dessa tese, seja lendo, dando dicas, idéias, incentivos, emprestando material, fazendo mudas, pesando amostras, dando carona ou ofertando o braço para que eu não desistisse: Cassiana de Oliveira, Mônica Bolson, Ana Paula Cardoso, Mariana Franca, Lury Fuero, Ana Paula de Azevedo, Paulo Carvalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos estagiários de iniciação científica Alaíde Z. Ribeiro e Juliana A. Lopes que auxiliaram na confecção do capítulo 4.

Às amigadas que adquiri nesses últimos anos no grupo Maracatu Aroeira, no Maracatu Morro do Ouro, Baque Mulher e em Recife, que me fortaleceram para que eu não desistisse e me abriram novos horizontes e perspectivas.

## RESUMO

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma espécie de palmeira importante para produção de palmito e apresenta boas características para o plantio comercial, como precocidade no corte e rusticidade. A embriogênese somática pode ser utilizada para multiplicação clonal de genótipos de interesse. Protocolos já foram desenvolvidos para essa espécie, que geraram plantas aclimatizadas com sucesso, porém a compreensão de todo o processo ainda não foi alcançada e o refinamento do protocolo é necessário para tornar a produção de mudas através dessa técnica viável comercialmente. Os objetivos desse trabalho foram avaliar diferentes compostos adicionados ao meio de cultura na maturação dos embriões somáticos de pupunha, analisar o perfil metabólico do processo de maturação, aprimorar um sistema de imersão temporária para mudas obtidas por embriogênese somática e estudar as alterações anatômicas encontradas em folhas de plantas crescidas sob diferentes condições de cultivo e a absorção de compostos pelos tecidos vegetais. Os resultados mostraram diferenças morfológicas e metabólicas nas respostas dos embriões aos tratamentos de maturação com sacarose, glicose, manitol, sorbitol e polietilenoglicol. Também foi possível observar diferenças no crescimento das mudas cultivadas no sistema de imersão temporária em função do meio de cultura utilizado. A análise das folhas de plantas crescidas *in vitro*, em casa de vegetação e provenientes da embriogênese somática mostrou alterações na morfoanatomia relacionadas às diferentes condições de crescimento. Utilizando o corante Lucifer Yellow, foi possível observar a absorção de glicose pelo apoplasto e simplasto das células das lâminas foliares de plantas submetidas ao cultivo em sistema de imersão temporária. Os resultados permitirão melhorar o processo de embriogênese e no cultivo das mudas em sistema de imersão temporária.

**Palavras-chave:** Arecaceae, carboidratos, estresse osmótico, metabólitos primários, pupunheira.

## ABSTRACT

The peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) is an important species for heart-of-palm production that presents good characteristics for commercial planting, such as precocity and rusticity. Somatic embryogenesis technique can be used for clonal multiplication of genotypes of interest. Protocols have already been developed for this species and plants have been successfully generated and acclimatized, but the understanding of the whole process has not yet been achieved and the protocol needs to be improved in order to make viable the commercial plant production through this system. The aims of this study were to evaluate how different compounds of the culture medium affect somatic embryo maturation, to analyze the metabolic profile of the maturation process, to improve the protocol of a temporary immersion system, to study the leaf anatomical alterations found in different culture conditions, and finally to analyse the absorption of compounds by the tissues cultured *in vitro*, using an apoplastic tracer. The results showed morphological and metabolic differences in the responses of the embryos to the maturation treatments with sucrose, glucose, mannitol, sorbitol and polyethylene glycol. It was also possible to observe differences in the plantlets cultured in the temporary immersion system in function of the culture medium used. Finally, the leaf blade analysis of *in vitro* grown, greenhouse and somatic embryo-derived plants showed changes in morphoanatomy related to the different growth conditions. Using Lucifer Yellow stain, it was possible to observe the glucose absorption by the apoplast and symplast of the leaf blade cells of plants submitted to temporary immersion system culture. The results allowed to improve the somatic embryogenesis process and the plantlets culture under temporary immersion.

**Key words:** Arecaceae, carbohydrates, osmotic stress, peach palm, primary metabolism.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> APÓS 30 DIAS NO MEIO DE CONVERSÃO CONTENDO SACAROSE OU GLICOSE.....	33
FIGURA 2 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E GLICOSE SOBRE A CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> APÓS 30 DIAS EM MEIO DE CONVERSÃO .....	34
FIGURA 3- EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE POLIETILENOGLICOL E SORBITOL NO MEIO DE MATURAÇÃO SOBRE A CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> APÓS 30 DIAS EM MEIO DE CONVERSÃO.....	36
FIGURA .4 - EMBRIÕES SOMÁTICOS CONVERTIDOS DE <i>Bactris gasipaes</i> APÓS 30 DIAS NO MEIO DE CONVERSÃO CONTENDO PEG 6000® .....	37
FIGURA .5 - EMBRIÕES SOMÁTICOS CONVERTIDOS DE <i>Bactris gasipaes</i> APÓS 30 DIAS NO MEIO DE CONVERSÃO .....	38
FIGURA.6 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TRIACONTANOL ADICIONADO NO MEIO DE MATURAÇÃO SOBRE A CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> APÓS 30 DIAS EM MEIO DE CONVERSÃO .....	40
FIGURA .7 - EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH CONVERTIDOS APÓS 30 DIAS NO MEIO DE CONVERSÃO CONTENDO TRIACONTANOL.....	41

### CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH .....	57
FIGURA 2 - SCORES DOS TRATAMENTOS (A) E CONJUNTO DE COMPOSTOS (B) NOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> APÓS 45 DIAS DE MATURAÇÃO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA .....	60
FIGURA 3 - ANÁLISE DE REGRESSÃO PLS DOS METABÓLITOS PRESENTES EM <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO MEIO DE MATURAÇÃO COM SACAROSE ENTRE 7 E 45 DIAS DE CULTIVO .....	62

FIGURA 4 - ANÁLISE DE REGRESSÃO PLS DOS METABÓLITOS PRESENTES EM <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO MEIO DE MATURAÇÃO CONTENDO GLICOSE ENTRE 7 E 45 DIAS DE CULTIVO .....	63
FIGURA 5 ANÁLISE DE REGRESSÃO PLS DOS METABÓLITOS PRESENTES EM <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO MEIO DE MATURAÇÃO CONTENDO POLIETILENOGLICOL ENTRE 7 E 45 DIAS DE CULTIVO .....	64
FIGURA 6. ANÁLISE DE REGRESSÃO PLS DOS METABÓLITOS PRESENTES EM <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO MEIO DE MATURAÇÃO CONTENDO SORBITOL ENTRE 7 E 45 DIAS DE CULTIVO. ....	65
FIGURA 7- ANÁLISE DE REGRESSÃO PLS DOS METABÓLITOS PRESENTES EM <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO MEIO DE MATURAÇÃO CONTENDO MANITOL ENTRE 7 E 45 DIAS DE CULTIVO.....	66

### **CAPÍTULO 3**

FIGURA 1 - CULTIVO DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA .....	86
FIGURA 2 PLANTAS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH CRESCIDAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA POR 90 DIAS.....	88

### **CAPÍTULO 4**

FIGURA 1 - SECÇÕES TRANSVERSAIS DE LÂMINAS FOLIARES DE <i>Bactris gasipaes</i> Kunth EM TRÊS CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	108
FIGURA 2 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE LÂMINAS FOLIARES DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH. ....	111
FIGURA 3 ABSORÇÃO DO TRAÇADOR LUCIFER YELLOW CH EM LÂMINAS FOLIARES E RAÍZES DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH CULTIVADAS EM MEIO LÍQUIDO E SÓLIDO .....	113

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

TABELA 1 - MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE <i>Bactris gasipaes</i> . ....	29
TABELA 2 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E GLICOSE SOBRE A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> APÓS 30 DIAS EM MEIO DE MATURAÇÃO .....	32
TABELA 3 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE POLIETILENOGLICOL E DE SORBITOL SOBRE A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>BACTRIS GASIPAES</i> APÓS 30 DIAS EM MEIO DE MATURAÇÃO.....	35
TABELA 4 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TRIACONTANOL SOBRE A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> APÓS 30 DIAS EM MEIO DE MATURAÇÃO. ....	39

### CAPÍTULO 2

TABELA 1- COMPOSTOS ENCONTRADOS NO EXTRATO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> APÓS 45 DIAS DE MATURAÇÃO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA .....	61
TABELA 2 - METABÓLITOS REPRESENTATIVOS DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO 7º E 45º DIA DE MATURAÇÃO.....	67

### CAPÍTULO 3

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO MINERAL DOS TRÊS MEIOS DE CULTURA USADOS NO SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA. ....	84
TABELA 2 - CRESCIMENTO DE PLANTAS DE <i>Bactris gasipaes</i> APÓS 12 SEMANAS DE CULTIVO EM TRÊS MEIOS DE CULTURA EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA .....	87
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MINERAL DE PLANTAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS POR 12 SEMANAS EM TRÊS MEIOS DE CULTURA EM UM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA. ....	89

### CAPÍTULO 4

TABELA 1 QUANTIFICAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LÂMINAS FOLIARES DE PLANTAS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH PROVENIENTES DA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> , DE CASA DE VEGETAÇÃO E DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA. ....	110
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS

BCAT - *branched chain amino acid transaminase*

CG-EM - cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massa

LEA - *later embryogenesis abundant*

LYCH - *Lucifer Yellow Carbohidrazide Dilithium Salt*

PBS - *phosphate-buffered saline*, tampão fosfato salino

PCA - *principal component analysis* – Análise dos Componentes Principais

PLS - *partial least squares*

PEG - polietilenoglicol

RMN- ressonância magnética nuclear

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>18</b>
<b>CÁPITULO 1 - CARBOIDRATOS, AGENTES OSMÓTICOS E TRIACONTANOL NA MATURAÇÃO E CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH.....</b>	<b>22</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	27
3.2 INTRODUÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS <i>IN VITRO</i> E INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE.....	28
3.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA SECUNDÁRIA.....	28
3.4 EXPERIMENTOS DE MATURAÇÃO E CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS .....	29
3.4.1 Efeito de fontes de carbono e PEG na maturação e conversão de embriões .....	29
3.4.2 Efeito do triacontanol na maturação de embriões.....	30
3.5 CONDIÇÕES DE CULTURA .....	30
3.6 AVALIAÇÕES, DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
4.1 EFEITO DE FONTES DE CARBONO E DE PEG NA MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	31
4.2 EFEITO DO TRIACONTANOL NA MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	38
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>
<b>CÁPITULO 2 - METABOLÔMICA NA CARACTERIZAÇÃO DA MATURAÇÃO DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE PUPUNHA (<i>Bactris gasipaes</i> KUNTH.) .....</b>	<b>50</b>

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
3.1 ORIGEM DO MATERIAL EMBRIOGÊNICO E EXPERIMENTOS DE MATURAÇÃO.....	55
3.2 EXTRAÇÃO E ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	56
3.3 TRATAMENTO PÓS ANÁLISES .....	58
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	58
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
<b>5.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>
<b>CAPÍTULO 3 - CULTIVO DE PUPUNHEIRA (<i>Bactris gasipaes</i> KUNTH) EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA .....</b>	<b>78</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>82</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>82</b>
3.1 INDUÇÃO, MATURAÇÃO E CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS .....	82
3.2 CULTIVO NO SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	83
3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MINERAL .....	84
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	85
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>86</b>
<b>5.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>92</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>
<b>CAPÍTULO 4 - MORFOANATOMIA DE PLANTAS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i> E ANÁLISE DE ABSORÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....</b>	<b>98</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>102</b>

2.1 OBJETIVO GERAL .....	102
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	102
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	102
3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	102
3.2 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	103
3.3 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	103
3.4 GERMINAÇÃO <i>EX VITRO</i> .....	104
3.5 HISTOLOGIA.....	104
3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	105
3.7 ANÁLISE DA ABSORÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....	105
3.7.1 Material vegetal.....	105
3.7.2 Plantas cultivadas em meio semi-sólido .....	105
3.7.3 Plantas cultivadas no sistema de imersão temporária .....	106
<b>4. RESULTADOS</b> .....	106
4.1 HISTOLOGIA .....	106
4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	110
4.3 ANÁLISE DO TRANSPORTE APOPLÁSTICO .....	111
<b>5.DISSCUSSÃO</b> .....	114
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	117
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	118
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	123
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	124
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	125
<b>APÊNDICES</b> .....	130
APÊNDICE 1. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS MATUROS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO TRATAMENTO COM SACAROSE E GLICOSE .....	131
APÊNDICE 2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS VIÁVEIS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO TRATAMENTO COM SACAROSE E GLICOSE .....	131
APÊNDICE 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA EMBRIOGÊNESE SECUNDÁRIA DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO TRATAMENTO COM SACAROSE E GLICOSE .....	131



APÊNDICE 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PARTE AÉREA DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO TRATAMENTO COM SACAROSE E GLICOSE.....	132
APÊNDICE 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PARTE RADICULAR DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO TRATAMENTO COM SACAROSE E GLICOSE.....	132
APÊNDICE 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE EMBRIÕES MATUROS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO TRATAMENTO COM PEG E SORBITOL.....	133
APÊNDICE 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE EMBRIÕES MATUROS VIÁVEIS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO TRATAMENTO COM PEG E SORBITOL .....	133
APÊNDICE 8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO TRATAMENTO COM PEG E SORBITOL.....	134
APÊNDICE 9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PARTE AÉREA DE EMBRIÕES CONVERTIDOS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO TRATAMENTO COM PEG E SORBITOL .....	134
APÊNDICE 10. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PARTE RADICULAR DE EMBRIÕES CONVERTIDOS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO TRATAMENTO COM PEG E SORBITOL .....	134
APÊNDICE 11. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE EMBRIÕES MATUROS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO TRATAMENTO COM TRIACONTANOL .....	135
APÊNDICE 12. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE EMBRIÕES MATUROS VIÁVEIS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO TRATAMENTO COM TRIACONTANOL .....	135
APÊNDICE 13 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA EMBRIOGÊNESE SECUNDÁRIA DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH NO TRATAMENTO COM TRIACONTANOL.....	135
APÊNDICE 14. CURVA DA REGRESSÃO PLS ENTRE O 7º E O 45º DIA DE MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH FEITA NO TRATAMENTO COM SACAROSE.....	136
APÊNDICE 15 CURVA DA REGRESSÃO PLS ENTRE O 7º E O 45º DIA DE MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH FEITA NO TRATAMENTO COM GLICOSE.....	136

APÊNDICE 16. CURVA DA REGRESSÃO PLS ENTRE O 7º E O 45º DIA DE MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH FEITA NO TRATAMENTO COM POLIETILENOGLICOL .....	137
APÊNDICE 17 CURVA DA REGRESSÃO PLS ENTRE O 7º E O 45º DIA DE MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH FEITA NO TRATAMENTO COM SORBITOL .....	137
APÊNDICE 18. CURVA DA REGRESSÃO PLS ENTRE O 7º E O 45º DIA DE MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Bactris gasipaes</i> KUNTH FEITA NO TRATAMENTO COM MANITOL .....	138
APÊNDICE 19 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE FOLHAS DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	138
APÊNDICE 20 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	138
APÊNDICE 21– ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TAMANHO DE FOLHAS DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	139
APÊNDICE 22 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TAMANHO DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	139
APÊNDICE 23 ANÁLISE ESTATÍSTICA MASA FRESCA DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	139
APÊNDICE 24 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA MASSA SECA DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	140
APÊNDICE 25 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE NITROGÊNIO DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA .....	140
APÊNDICE 26 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE CÁLCIO DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA .....	140

APÊNDICE 27 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE COBRE DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA .....	141
APÊNDICE 28 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE FERRO DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA .....	141
APÊNDICE 29 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE POTÁSSIO DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA .....	141
APÊNDICE 30 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE MAGNÉSIO DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	142
APÊNDICE 31 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE MANGANÊS DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA .....	142
APÊNDICE 32 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE FÓSFORO DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA .....	142
APÊNDICE 33 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE ZINCO DE PLÂNTULAS DE <i>Bactris gasipaes</i> CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	143

## INTRODUÇÃO GERAL

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) pertence à família Arecaceae e é a única palmeira domesticada na América tropical (CLEMENT; MORA URPI, 1987). Essa espécie ocorre naturalmente desde Honduras, na América Central, até a Venezuela, Colômbia, Guianas, Peru, Equador, Bolívia e região Norte do Brasil, possuindo grande potencial alimentício e econômico (CLEMENT, 2008). Os frutos podem ser consumidos *in natura* e utilizados na produção de óleo, farinha e ração animal. O plantio destinado à produção de palmito apresenta, devido à precocidade do corte, o bom perfilhamento, a ausência de oxidação do palmito, a rusticidade e a rentabilidade da espécie, uma ótima opção para os produtores, tanto nos sistemas de manejo sustentável quanto nos sistemas racionais (NEVES, *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2013).

O mercado brasileiro destaca-se como maior produtor e consumidor de palmito, sendo que a maior parte do palmito é proveniente do açai (*Euterpe oleraceae*) e juçara (*Euterpe edulis*), seguido do cultivo de pupunha (PENTEADO JUNIOR, *et al.*, 2014). O mercado externo tem potencial a ser conquistado, já que os maiores exportadores de pupunha e líderes do mercado internacional ainda são a Costa Rica e Equador (MODOLO *et al.*, 2012). Uma das formas de melhorar a produção do palmito em campo é a seleção e multiplicação de genótipos superiores, através de técnicas de propagação clonal.

A embriogênese somática é uma técnica importante para a produção massal e uniforme de plantas, também utilizada para estudos básicos de fisiologia e bioquímica e na compreensão dos fatores que regulam a embriogênese (KHAN, *et al.*, 2015). Esse processo começa a partir de uma única célula ou um grupo de células somáticas que adquirem competência embriogênica e proliferam, seguido de uma fase de crescimento e desenvolvimento do embrião somático (ELHITI, *et al.*, 2010). Os embriões somáticos passam pelas mesmas etapas de desenvolvimento do embrião zigótico: globular, cordiforme e torpedo para eudicotiledôneas; globular, escutelar e coleptilar para monocotiledôneas. Os protocolos de embriogênese somática envolvem diferentes etapas: indução e formação de calos

embriogênicos ou de embriões somáticos, multiplicação de calos embriogênicos ou embriões somáticos, maturação e conversão dos embriões em plântulas (VON ARNOLD, 2002).

A produção de mudas através da embriogênese somática pode satisfazer a demanda dos produtores interessados no plantio de espécies de palmeiras com boa qualidade de palmito ou dos frutos (ABAHMANE, 2011; BEKHEET, 2013). Além disso, a técnica pode ser automatizada, com biorreatores, por exemplo, levando a melhoria da propagação a um baixo custo (ETIENNE *et al.*, 2006). No entanto, a técnica é muito custosa, principalmente quando se trata de espécies arbóreas, sendo a redução dos custos um dos desafios mais importantes para alavancar a produção de mudas por embriogênese somática. A base para refinar os protocolos existentes consiste na compreensão dos processos regulatórios do desenvolvimento durante a regeneração da planta (DOBROWOLSKA *et al.*, 2017).

Em pupunha foram desenvolvidos protocolos de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros (STEINMACHER *et al.*, 2007a) e imaturos (MACIEL *et al.*, 2010), inflorescências imaturas (STEINMACHER *et al.*, 2007b), meristemas e primórdios foliares (STEINMACHER *et al.*, 2007c). Além disso, foi observada a ocorrência de embriogênese somática secundária e também um aumento da regeneração de plantas através de um sistema de imersão temporária, quando comparada com o cultivo em meio sólido (STEINMACHER *et al.*, 2011).

O sistema de imersão temporária, que envolve a inundação parcial automatizada do tecido vegetal em intervalos regulares de tempo, é relevante para a ampliação ou melhoria dos protocolos de regeneração *in vitro* e também abre possibilidades para automatizar algumas fases da cultura *in vitro* (STEINMACHER *et al.*, 2011). Esse sistema permite um maior controle das condições do cultivo (pH, taxa de aeração, oxigenação e concentração de etileno e gás carbônico), podendo acelerar o processo de micropropagação (ETIENNE *et al.*, 2006).

Segundo Etienne *et al.* (2006) existem poucos trabalhos avaliando o efeito do sistema de imersão temporária sobre a fisiologia das plantas. Todavia sabe-se que ele estimula a qualidade das mudas em pupunha, porém a taxa

de sobrevivência ainda é baixa (STEINMACHER *et al.*, 2011) necessitando otimizar o protocolo para obtenção de uma quantidade maior de plantas.

A regeneração das plantas é essencial para estabelecer um sistema de cultura eficiente, por isso são necessários estudos aprofundados para compreender a resposta da espécie ao sistema de cultura utilizado. No caso das palmeiras, poucos trabalhos estudam a morfofisiologia das plantas durante a conversão dos embriões em plântulas e a aclimatização (BATAGIN-PIOTTO *et al.*, 2012). Para manipular o sistema *in vitro*, o domínio da fisiologia do desenvolvimento é necessário. Estudos bioquímicos associados a morfológicos durante a embriogênese somática em diferentes espécies geram informações importantes relacionadas com a indução da competência embriogênica e o acúmulo de reservas durante a maturação, entre outros processos (KOMAMINE *et al.*, 1991).

O refinamento do protocolo de embriogênese somática é um processo demorado, e cada genótipo pode responder de formas variadas à modificação do meio de cultura em cada etapa do processo. O tipo de carboidrato utilizado na cultura *in vitro* é muito importante, visto que atua como fonte de energia no processo e também como agente osmótico, afetando o crescimento e diferenciação dos embriões somáticos através da regulação da expressão gênica (GIBSON, 2000; LIPAVSKA *et al.*, 2000). O tipo e a concentração do carboidrato podem variar não só de acordo com a espécie, mas também de acordo com a etapa do processo de embriogênese somática. Além disso, outras substâncias podem afetar o desenvolvimento dos explantes *in vitro*, como o triacontanol, um álcool primário promotor de crescimento vegetal retirado da cera epicuticular de várias espécies vegetais (TANTOS *et al.*, 2001, NAEEM *et al.*, 2012).

Poucos estudos avaliam os efeitos da nutrição mineral sobre a morfogênese vegetal (RAMAGE; WILLIAMS, 2002), principalmente quando se trata das culturas em meio líquido. A composição do meio de cultura em macronutrientes e micronutrientes pode estar inadequada, acarretando um crescimento anormal e baixas taxas de conversão (RUZIC *et al.*, 2000). O equilíbrio nutricional do meio de cultura é determinante para a produtividade *in vitro*.

O desenvolvimento de novos meios é geralmente feito a partir de modificações de formulações clássicas, como o meio MS (GRIBBLE *et al.*, 2002). Um estudo das necessidades nutricionais associado com estudos morfofisiológicos dos explantes cultivados em sistema de imersão temporária pode levar a uma otimização da composição do meio e então a um aumento do crescimento de plantas de pupunha.

O objetivo geral desse trabalho foi compreender melhor a embriogênese somática em *Bactris gasipaes*, através de algumas análises em diferentes etapas do processo, com a finalidade de incrementar o protocolo já estabelecido, aumentando a qualidade das mudas produzidas.

Essa tese descreve uma investigação dos efeitos de alguns compostos adicionados ao meio de cultura nas etapas de maturação e conversão dos embriões somáticos de pupunha (CAPÍTULO 1), seguido de uma análise metabólica do processo de maturação (CAPÍTULO 2), tentando relacionar os compostos adicionados ao meio de cultura com as mudanças encontradas no metabolismo dos embriões. No Capítulo 3 é mostrado o efeito de diferentes meios de cultura no crescimento das plântulas provenientes de embriogênese somática em um sistema de imersão temporária e discutido o efeito de alguns elementos minerais que influenciam o crescimento *in vitro*. Por último, no capítulo 4, foram investigadas as alterações morfoanatômicas de plântulas obtidas por embriogênese somática, germinação *in vitro* e *ex vitro*, relacionando essas alterações com os três ambientes de cultivo e também foi investigada a absorção de compostos pelas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, no sistema semi-sólido e no sistema de imersão temporária.

## **CÁPITULO 1**

### **CARBOIDRATOS, AGENTES OSMÓTICOS E TRIACONTANOL NA MATURAÇÃO E CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* KUNTH**



## RESUMO

O processo de embriogênese somática já foi estabelecido para a pupunheira, mas alguns ajustes nas fases de maturação e conversão ainda são necessários. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes compostos do meio de cultura na maturação dos embriões somáticos de pupunha, para obter plântulas bem formadas após a aclimatização. O material embriogênico utilizado foi proveniente de embriões zigóticos. Embriões somáticos globulares foram mantidos em multiplicação em meio de cultura com sais do MS, vitaminas de Morel e Wetmore, 0,05% de glutamina, 10  $\mu\text{M}$  de Picloram e 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$ . Durante a etapa de maturação dos embriões somáticos, foram testadas diferentes concentrações de sacarose, glicose, sorbitol ou manitol (15, 30, 45 e 60  $\text{g.L}^{-1}$ ), PEG (100, 200 e 300  $\text{mg.L}^{-1}$ ) ou triacontanol (2,27; 5,70; 11,39; 22,77  $\mu\text{M}$ ) adicionados ao meio de cultura. Após 30 dias, o material foi transferido para meio de conversão, contendo 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e foi avaliada a formação de folhas e raízes após 30 dias. O tratamento com maior formação de embriões somáticos maduros foi o meio contendo 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose. Os embriões que foram cultivados na presença de sorbitol (30 e 45  $\text{g.L}^{-1}$ ) ou PEG (200 e 300  $\text{mg.L}^{-1}$ ) formaram plântulas com raízes bem desenvolvidas após 30 dias em meio de conversão, contendo 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose. O manitol inibiu o desenvolvimento dos embriões somáticos enquanto o tricontanol não teve efeito positivo. O meio indicado para maior produção de embriões maduros é o com 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, mas para obtenção de embriões melhor individualizados e com raízes desenvolvidas, os meios contendo PEG e sorbitol são mais adequados.

Palavras-Chave: Arecaceae, embriogênese somática, palmeiras, pupunheira, sorbitol.

## ABSTRACT

The somatic embryogenesis process was already established for peach palm, but some improvements are still needed during maturation and conversion steps. The main purpose of this study was to evaluate the effect of different compounds added to the culture medium during somatic embryo maturation step, in order to reach well-formed plantlets after acclimatization. The embryogenic material used in the maturation experiments was developed from zygotic embryos. Globular somatic embryos were maintained under multiplication in a culture medium composed of MS salts, Morel and Wetmore vitamins, glutamine 0.05%, Picloram 10  $\mu\text{M}$  and  $\text{AgNO}_3$  1  $\mu\text{M}$ . For maturation, 15, 30, 45 and 60  $\text{g.L}^{-1}$  of sucrose, glucose, sorbitol or manitol; PEG (100, 200 and 300  $\text{mg.L}^{-1}$ ) and triacontanol (2,27; 5,70; 11,39; 22,77  $\mu\text{M}$ ) were tested during 30 days. The explants were then transferred to conversion medium, containing 30  $\text{g.L}^{-1}$  sucrose and the shoot and root formation evaluated after 30 days. The sucrose (30  $\text{g.L}^{-1}$ ) treatment induced a higher number of mature somatic embryos than the other compounds. When sorbitol (30 e 45  $\text{g.L}^{-1}$ ) or PEG (200 e 300  $\text{mg.L}^{-1}$ ) were present in the maturation medium, the plantlets were better individualized, with evident roots after 30 days on conversion medium. The manitol inhibited somatic embryo development and triacontanol had no positive effect. The medium for higher mature somatic embryo formation was 30  $\text{g.L}^{-1}$  sucrose, but for better individualized somatic embryos and well-formed roots, the PEG and sorbitol were more suitable.

Key words: Arecaceae, peach palm, palm tree, polyethyleneglycol, somatic embryogenesis, sorbitol

## 1. INTRODUÇÃO

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma palmeira domesticada amplamente cultivada na América, primeiramente para uso de seus frutos e atualmente de grande importância para produção de palmito de alta qualidade, com grande impacto econômico na Costa Rica, Equador e Brasil (GRAEFE *et al.*, 2013). Possui crescimento rápido, boa adaptabilidade à diferentes regiões e boa produtividade (BOVI, 1997).

A propagação da pupunha se dá por sementes e por perfilhamento, mas o uso de perfilhos, visando à propagação clonal, não é indicado, visto que a taxa de enraizamento é baixa (TRACZ *et al.*, 2009). Sendo assim, a cultura de tecidos é considerada a estratégia mais adequada para a propagação clonal da espécie (MORA-URPI *et al.*, 1997).

A embriogênese somática é uma técnica na qual células somáticas são induzidas a formar estruturas bipolares, passando por vários estádios de desenvolvimento semelhantes ao que ocorre na embriogênese zigótica. A técnica é ideal para uma alta produção de plantas geneticamente homogêneas (SCHMILDT *et al.*, 2007), permitindo a clonagem de cultivares ou genótipos de interesse.

Em pupunheira, protocolos de indução de embriões somáticos e sua conversão em plantas foram desenvolvidos com sucesso a partir de diferentes explantes (STEINMACHER *et al.*, 2007a, 2007b, 2007c) e a ocorrência de embriogênese somática secundária permitiu a multiplicação e manutenção de culturas cíclicas (STEINMACHER *et al.*, 2011). Entretanto, o crescimento das mudas após aclimatização é ainda muito lento e a otimização da etapa de maturação e conversão é necessária para produzir mais plantas com uma qualidade superior e em menor tempo.

Uma vez que a produção de embriões somáticos envolve várias etapas, indução de massas embriogênicas e embriões somáticos, maturação e conversão dos embriões em plântulas; o esforço para aumentar o número e a qualidade dos embriões deve incluir a manipulação do ambiente de cultura em cada parte do processo (STASOLLA; YEUNG, 2003). O meio de cultura é um fator crucial na regeneração das plantas durante o cultivo *in vitro*. A sacarose

é a fonte de carbono mais utilizada nos meios de cultura, mas outros carboidratos podem ser empregados, como glicose e maltose, bem como açúcares-álcool, como sorbitol e manitol (HASSAN; TAHA, 2012). Em determinadas etapas da embriogênese somática, a fonte de carbono utilizada pode afetar a formação de embriões somáticos, melhorando sua qualidade, a taxa de conversão e sobrevivência das plantas formadas durante a aclimatização (WALKER; PARROT, 2001; ZOUINE; EL-HADRAMI, 2004).

A maturação é considerada uma etapa fundamental do desenvolvimento do embrião zigótico e somático, permitindo o sucesso da conversão e posterior desenvolvimento da plântula (PERÁN-QUESADA *et al.*, 2004). Durante o processo dentro da semente, ocorre a síntese de reservas e a desidratação gradual dos embriões com consequente redução do seu metabolismo (VON ARNOLD *et al.*, 2002). O mesmo ocorre na maturação dos embriões somáticos, na qual os carboidratos e outras substâncias, como o polietileno glicol (PEG), podem modificar a osmolaridade do meio e influenciar o transporte através das membranas e atuar a regulação gênica (BUSINGE *et al.*, 2013). Essa condição assemelha-se ao efeito do estresse hídrico que ocorre durante a maturação do embrião dentro da semente, o que permite que o mesmo sobreviva ao processo de desidratação (BEWLEY; BLACK, 1994).

Além da modificação da osmolaridade, o uso de estimulantes de crescimento vegetal na etapa de maturação pode acelerar o desenvolvimento dos embriões. O triacontanol é um álcool primário, componente de ceras epicuticulares das plantas, envolvido na promoção do crescimento, do metabolismo e na micropropagação vegetal, aumentando a taxa de multiplicação e melhorando o enraizamento (REDDY *et al.* 2002). Esse composto altera a fluidez da membrana do cloroplasto, além de alterar a atividade de várias enzimas relacionadas à fotossíntese e respiração, aumentando a taxa fotossintética e a mobilização de compostos (IVANOV, ANGELOV, 1997). Em relação à embriogênese somática, o composto favoreceu a iniciação da embriogênese em culturas de tecidos de *Pinus roxburghii* (MALABADI; NATARAJA, 2007) e *Pinus kesiya* (MALABADI *et al.*, 2005).

A maturação adequada dos embriões somáticos é um fator crucial para o sucesso do protocolo de embriogênese somática, portanto, a utilização de compostos que influenciem a maturação dos embriões somáticos de pupunha pode gerar plântulas saudáveis, não fusionadas e com sistema radicular bem formado, tornando a técnica vantajosa para a produção massal de mudas dessa espécie em nível comercial.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Otimizar o protocolo de embriogênese somática de pupunha, através da melhoria da maturação dos embriões somáticos, para obter maior número de plântulas bem formadas.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o efeito de fontes de carbono (sacarose, glicose, manitol e sorbitol) e do polietilenoglicol (PEG) em diferentes concentrações na maturação dos embriões somáticos.

Avaliar o efeito do triacontanol em diferentes concentrações na maturação dos embriões somáticos.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 MATERIAL VEGETAL**

As culturas embriogênicas utilizadas para produção de embriões somáticos foram obtidas de embriões zigóticos excisados de sementes de pupunha lisa, adquiridas do projeto RECA (Reflorestamento Econômico Consorciado Adensado), localizado em Rondônia.

### 3.2 INTRODUÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS *IN VITRO* E INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE

As sementes de pupunha foram descascadas e lavadas para a obtenção dos embriões zigóticos. Em condições assépticas, o material foi desinfestado com álcool 70% por 5 minutos e com uma solução de hipoclorito de sódio 10% adicionada de Tween 20® (0,1% v/v) por 20 minutos seguido de 3 lavagens com água deionizada esterilizada. O meio de cultura base para o experimento consistiu dos sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e vitaminas de Morel (MOREL; WETMORE, 1951). Os embriões foram retirados com ajuda de pinça e bisturi, sendo imediatamente inoculados em placas de Petri contendo aproximadamente 30 ml de meio de cultura de indução (TABELA 1)

As placas de Petri foram mantidas em sala de crescimento, no escuro, por aproximadamente 12 semanas, até o aparecimento de massas embriogênicas e embriões somáticos globulares.

### 3.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA SECUNDÁRIA

Os embriões somáticos globulares obtidos foram repicados para um meio de multiplicação e transferidos para meio fresco a cada 45 dias, sempre sendo mantidos no escuro.

TABELA 1 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Bactris gasipaes*.

Meios de Cultura *			
Indução	Multiplicação	Maturação	Conversão
Sacarose 3%	Sacarose 3%	Sacarose, glicose, manitol, sorbitol, PEG ou triacontanol	Sacarose 3%
Glutamina 0,05%	Glutamina 0,1%		-
Picloram 10µM	Picloram 10µM	Glutamina 0,1% Carvão ativado 0,15%	Carvão ativado 0,15%
AgNO <sub>3</sub> 1 µM	AgNO <sub>3</sub> 1 µM	-	-
Gelzan 0,25%	Gelzan 0,25%	Gelzan 0,25%	Ágar 0,7%

\* Contendo sais do MS e vitaminas de Morel.

### 3.4 EXPERIMENTOS DE MATURAÇÃO E CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS

Para os experimentos de maturação foram utilizados como explantes iniciais, grupos de embriões somáticos globulares com cerca de 3 mm de diâmetro e pesando  $20 \pm 10$  mg. O meio de maturação de base está descrito na Tabela 1. O material foi mantido em sala de crescimento na luz durante 30 dias. Após, o material foi transferido para o meio de conversão (TABELA 1).

#### 3.4.1 Efeito de fontes de carbono e PEG na maturação e conversão de embriões

Os explantes iniciais foram colocados no meio de maturação descrito na Tabela 1 com diferentes concentrações de sacarose (5, 15, 30, 45 ou 60 gL<sup>-1</sup>) ou glicose (15, 30, 45 ou 60 gL<sup>-1</sup>) e também foram testados o sorbitol e manitol nas concentrações de 15, 30, 45 e 60 gL<sup>-1</sup>, sem adição de sacarose, e PEG 6000® nas concentrações de 100, 200 e 300 mgL<sup>-1</sup> com adição de 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose. Nessa etapa, todas as culturas foram mantidas na luz com fotoperíodo de 16 horas, por 30 dias e avaliadas ao final do período. Após esse período, o material foi transferido para o meio de conversão (TABELA 1).

### 3.4.2 Efeito do triacontanol na maturação de embriões

Foram testadas quatro concentrações de triacontanol (2,27; 5,70; 11,39; 22,77  $\mu\text{M}$ ), dissolvido em etanol, comparadas com um meio controle sem triacontanol no meio de maturação contendo 30  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose. O material foi mantido nesse meio por 30 dias e depois foi transferido para o meio de conversão. A solução de triacontanol foi adicionada ao meio antes da autoclavagem.

### 3.5 CONDIÇÕES DE CULTURA

Todos os meios de cultura foram esterilizados através de autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos e distribuídos assepticamente em placas de Petri previamente esterilizadas por autoclavagem durante 30 minutos. O material vegetal foi mantido em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 3$  °C, sob lâmpadas fluorescentes com irradiância de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16h.

### 3.6 AVALIAÇÕES, DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições. Cada repetição consistiu em uma placa de Petri contendo 10 explantes cada. Após 30 dias em meio de maturação, foram avaliados o número de embriões somáticos maduros formados, a sua viabilidade (considerou-se os embriões verdes como viáveis e os brancos mal desenvolvidos como não viáveis) e a percentagem de explantes com embriogênese somática secundária. Após 30 dias em meio de conversão, foi avaliada a formação de parte aérea e parte radicular. As percentagens, quando não homogêneas, foram transformadas por  $\arcsen\sqrt{x}/100$  (indicado nas tabelas) e submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (APÊNDICE 1-20). Os experimentos com glicose, sacarose, sorbitol, manitol, PEG e triacontanol



foram realizados duas vezes. As análises estatísticas foram feitas utilizando as médias dos dois experimentos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 EFEITO DE FONTES DE CARBONO E DE PEG NA MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS

O efeito de diferentes concentrações de sacarose no número de embriões maduros foi marcante (TABELA 2). A menor concentração de sacarose ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) inibiu o desenvolvimento dos embriões somáticos e, conforme aumentou-se a quantidade do carboidrato, o número de embriões maduros aumentou, sendo que o resultado obtido na concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$  foi superior aos das outras concentrações.

A adição de glicose no meio não proporcionou diferença no número de embriões maduros, somente pode-se observar um aumento no número de embriões viáveis a partir de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de glicose no meio (TABELA 2).

Nas altas concentrações de sacarose e glicose, a embriogênese secundária (ESS) ocorreu e continuou, mesmo após o material ter sido transferido para a luz (TABELA 2). Em  $60 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, obteve-se a maior taxa de embriões com ESS, diferindo das concentrações inferiores a  $45 \text{ g L}^{-1}$ .

Os embriões maturando em meio com  $15 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e  $15 \text{ g L}^{-1}$  de glicose apresentaram hiperhidricidade (FIGURA 1 A, B) e, em altas concentrações de glicose ( $30$ ,  $45$  e  $60 \text{ g L}^{-1}$ ), houve maior desenvolvimento do pecíolo cotiledonar do que na sacarose (FIGURA 1 D, E, H). O número de embriões que estavam viáveis após 30 dias foi relativamente maior nos tratamentos com sacarose do que nos tratamentos com glicose (TABELA 2).

TABELA 2 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E GLICOSE SOBRE A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* APÓS 30 DIAS EM MEIO DE MATURAÇÃO.

Tratamento	ES	Viáveis (%)	ESS (%)
<b>Sacarose</b>			
15	0,82 b	97,56 a	26,83 bcd
30	3,4 a	95,30 a	15,88 d
45	1,4 b	65,71 ab	51,43 abc
60	1,48 b	89,19 a	67,57 a
<b>Glicose</b>			
15	1,12 b	19,64 bc	21,43 cd
30	1,34 b	80,59 ab	0,0 d
45	1,6 b	81,25 a	30,00 bcd
60	1,58 b	53,16 ab	49,37 ab
CV(%)	28,67	15,45	38,00

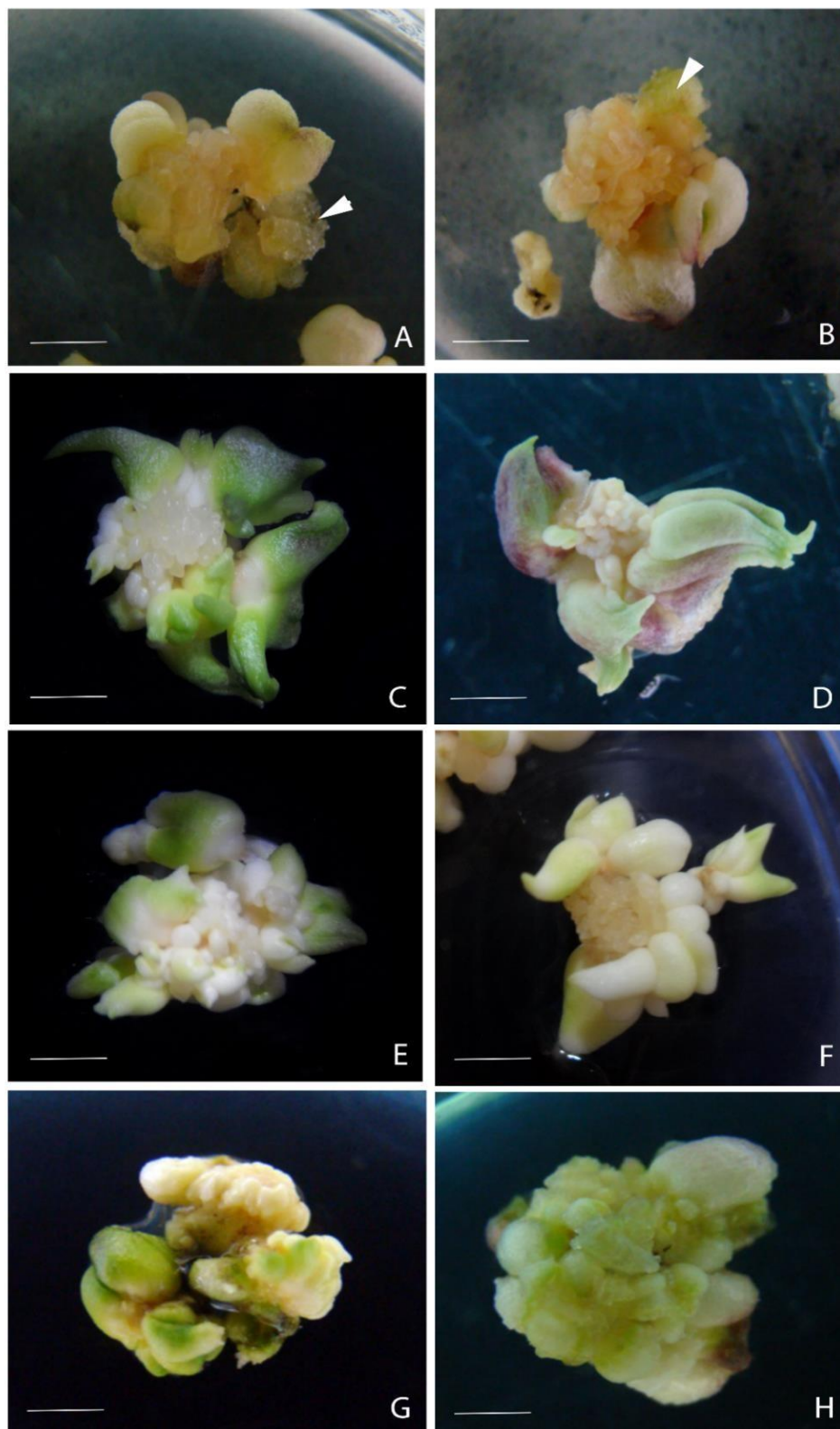
Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade.

ES: Número de embriões somáticos maduros por explante

\* Dados transformados por  $\arcsen\sqrt{x}/100$ .

ESS: embriogênese somática secundária

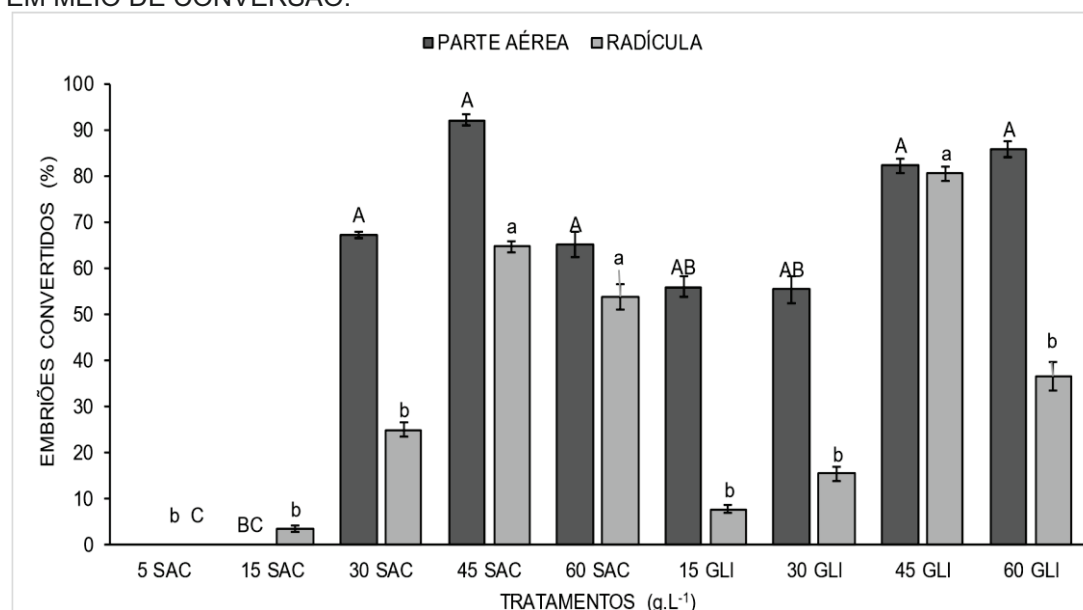
FIGURA 1 - EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* APÓS 30 DIAS NO MEIO DE CONVERSÃO CONTENDO SACAROSE OU GLICOSE. **A:** 15 g.L<sup>-1</sup> DE SACAROSE. BARRA= 5,5 mm **B:** 15g.L<sup>-1</sup> DE GLICOSE. BARRA= 6,5 mm **C:** 30 g.L<sup>-1</sup> DE SACAROSE. BARRA= 7,2 mm. **D:** 30 g.L<sup>-1</sup> DE GLICOSE. BARRA= 7,4 mm. **E:** 45 g.L<sup>-1</sup> DE SACAROSE. BARRA= 6,5 mm. **F:** 45 g.L<sup>-1</sup> DE GLICOSE. BARRA= 6,4 mm. **G:** 60 g.L<sup>-1</sup> DE SACAROSE. BARRA= 6,0mm. **H:** 60 g.L<sup>-1</sup> DE GLICOSE. BARRA= 6,2 mm. PONTAS DE SETA=HIPERHIDRICIDADE.



Após 30 dias no meio de conversão, observou-se diferenças no número de plântulas que apresentavam desenvolvimento da parte radicular e aérea (FIGURA 2). O número de embriões que emitiram folha e raiz aumentou até a concentração de 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose e de glicose, diminuindo ou ficando igual na concentração de 60 g L<sup>-1</sup>.

Durante a conversão, a maioria dos embriões começou a emitir a parte aérea e posteriormente a parte radicular, quando esta se desenvolvia. Nas baixas concentrações, o pecíolo cotiledonar se formou, mas não as partes aérea e radicular (FIGURA 1 A, B). Nas concentrações intermediárias de glicose e sacarose, pode-se observar a formação da parte aérea nos embriões convertidos, mas, na maioria deles, a parte radicular era reduzida ou ausente (FIGURA 1 C, D, E, F). Já nas maiores concentrações de glicose e sacarose, os embriões convertidos apresentavam-se menores ou somente com a parte aérea (FIGURA 1 G, H).

FIGURA.2 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E GLICOSE SOBRE A CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* APÓS 30 DIAS EM MEIO DE CONVERSÃO.



Valores seguidos da mesma letra maiúscula (parte aérea) e minúscula (parte radicular) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. SAC= sacarose, GLI=glicose.

Em relação ao experimento com o manitol, o desenvolvimento dos embriões foi inibido e o material foi descartado. Já nos meios de cultura contendo PEG ou sorbitol, observou-se uma diminuição do número de

embriões maduros em certos tratamentos, em relação ao controle com sacarose, mas a diferença entre o controle e os explantes cultivados na presença de PEG ou sorbitol só foi observada para as concentrações de 15, 30 e 60 g L<sup>-1</sup> de sorbitol e 300 mg L<sup>-1</sup> de PEG (TABELA 3). Não houve diferença em relação ao número de embriões viáveis.

TABELA 3 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE POLIETILENOGLICOL E DE SORBITOL SOBRE A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* KUNTH APÓS 30 DIAS EM MEIO DE MATURAÇÃO.

Tratamentos	ES*	Viáveis (%)	ESS (%)
30 g.L <sup>-1</sup> sacarose	3,24 a	80,56 ns	45,83 a
PEG (mg L <sup>-1</sup> )			
100	1,98 ab	87,88 ns	39,39 a
200	2,18 ab	86,24 ns	34,86 a
300	1,66 b	97,59 ns	37,35 a
Sorbitol (g L <sup>-1</sup> )			
15	0,62 b	61,29 ns	22,58 a
30	1,22 b	78,69 ns	44,26 a
45	1,96 ab	76,53 ns	45,92 a
60	1,06 b	100 ns	32,08 a
CV (%)	15,11	19,87	60,60

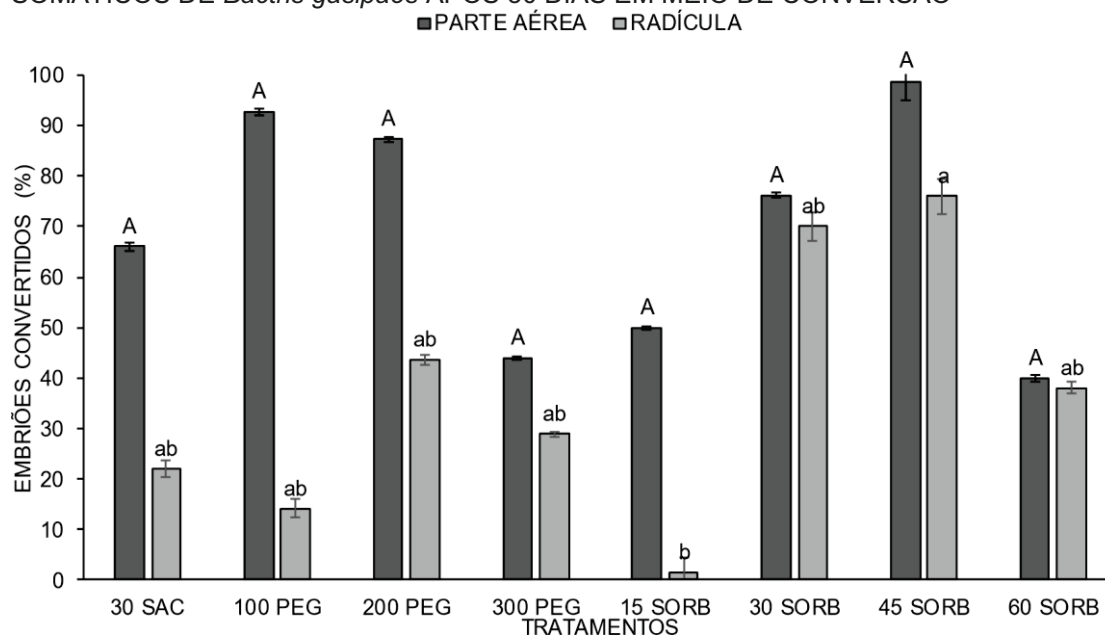
Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

\* Número de embriões somáticos maduros por explante

ESS: embriogênese somática secundária

Quanto à parte aérea, não houve diferença na porcentagem de plântulas que emitiram parte aérea, quando comparadas ao controle (FIGURA 3). Em relação à parte radicular, o tratamento com menor formação de raízes foi 15 g L<sup>-1</sup> de sorbitol, apesar de que estatisticamente só diferiu do tratamento com 45 g L<sup>-1</sup> de sorbitol (FIGURA 3).

FIGURA 3 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE POLIETILENOGLICOL E SORBITOL NO MEIO DE MATURAÇÃO SOBRE A CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* APÓS 30 DIAS EM MEIO DE CONVERSÃO



Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. SAC = gL<sup>-1</sup> PEG = mgL<sup>-1</sup>; SORB = gL<sup>-1</sup>

As plântulas provenientes dos meios com PEG e sorbitol estavam mais bem formadas, menos fusionadas e as raízes se apresentavam mais desenvolvidas e vigorosas quando comparadas com às provenientes dos meios com sacarose (FIGURA 2, 3 e 4). Os embriões convertidos com 100 mg L<sup>-1</sup> de PEG (FIGURA 3A) visualmente assemelhavam-se muito aos convertidos com sacarose e glicose (ver FIGURA 2 C, E). Já nas maiores concentrações de PEG testadas, os embriões estavam melhor individualizados e com raízes bem formadas, como pode ser observado nas Figuras 4B e 4C. Nos meios contendo sorbitol, os embriões somáticos estavam bem individualizados, com boa formação radicular e foliar (FIGURA 5 B e C).



FIGURA .4 - EMBRIÕES SOMÁTICOS CONVERTIDOS DE *Bactris gasipaes* APÓS 30 DIAS NO MEIO DE CONVERSÃO CONTENDO PEG 6000® **A:** 100 mg. L<sup>-1</sup> BARRA= 7,8 mm. **B:** 200 mg. L<sup>-1</sup>. BARRA= 11,9 mm. **C:** 300 mg. L<sup>-1</sup>. BARRA= 7 mm.

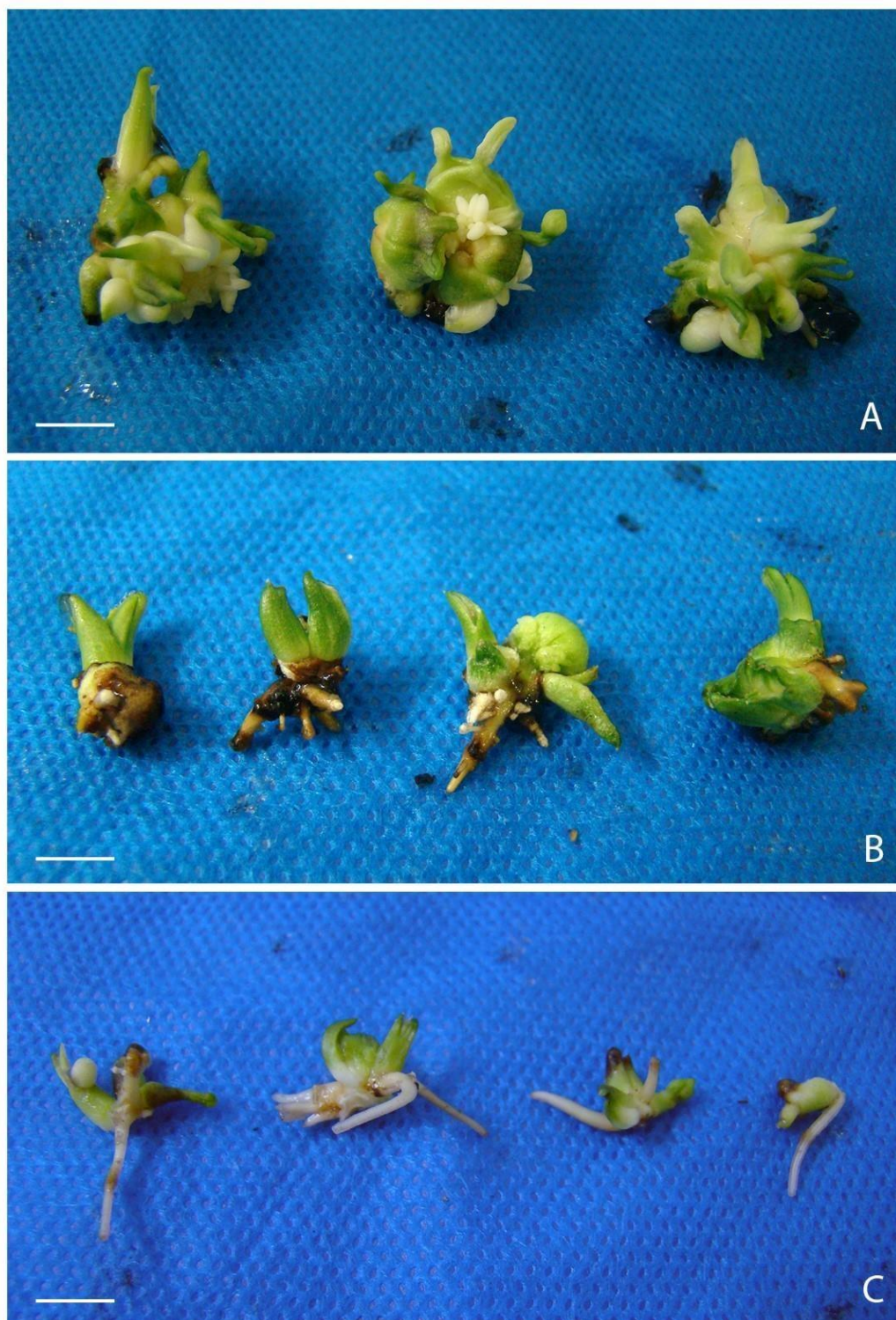
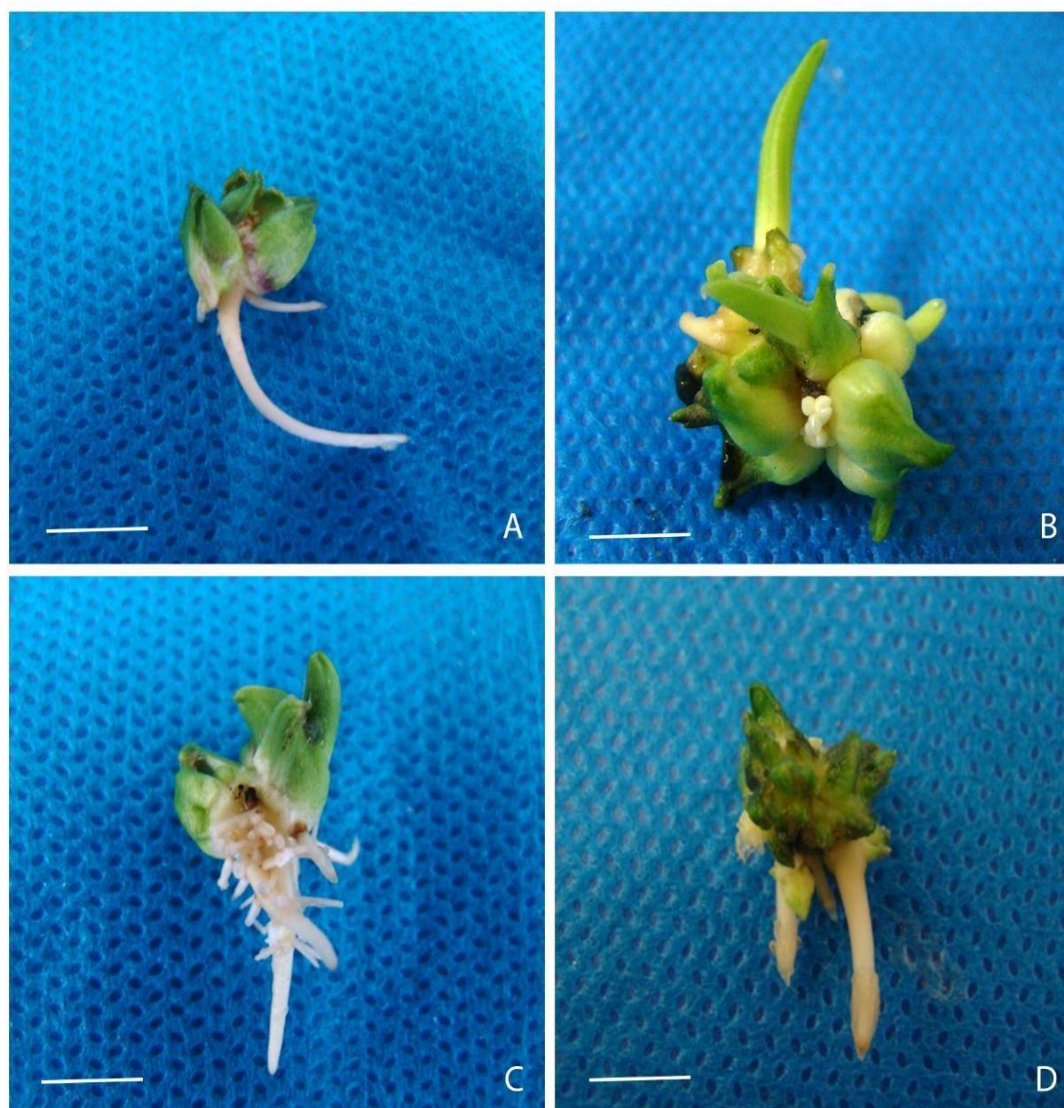


FIGURA .5 – EMBRIÕES SOMÁTICOS CONVERTIDOS DE *Bactris gasipaes* APÓS 30 DIAS NO MEIO DE CONVERSÃO. **A:** 15 g.L<sup>-1</sup> DE SORBITOL. BARRA= 13,4 mm. **B:** 30 g.L<sup>-1</sup> DE SORBITOL. BARRA= 7,8mm. **C:** 45 g.L<sup>-1</sup> DE SORBITOL. BARRA= 10,6 mm. **D:** 60 g.L<sup>-1</sup> DE SORBITOL. BARRA= 10,7 mm.



#### 4.2 EFEITO DO TRIACONTANOL NA MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS

Não houve diferença no número de embriões maduros, embriões viáveis e ESS em relação ao controle e entre as diferentes concentrações de triacontanol após 30 dias (TABELA 4). Os embriões desenvolveram-se mais fusionados e apresentaram desenvolvimento do pecíolo cotiledonar.

Após 30 dias no meio de conversão houve emissão de parte aérea, mas a maioria não emitiu a parte radicular (FIGURA 6). O tratamento com 22,77  $\mu$ M



de triacontanol inibiu o desenvolvimento de parte aérea e radicular nos explantes. A presença de plantas hiperhídricas foi bem acentuada (FIGURA 7 B, D) e pode-se observar plantas fusionadas (FIGURA 7 A, C) e com desenvolvimento anormal das raízes (FIGURA 7 B).

TABELA 4 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TRIACONTANOL SOBRE A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* APÓS 30 DIAS EM MEIO DE MATURAÇÃO.

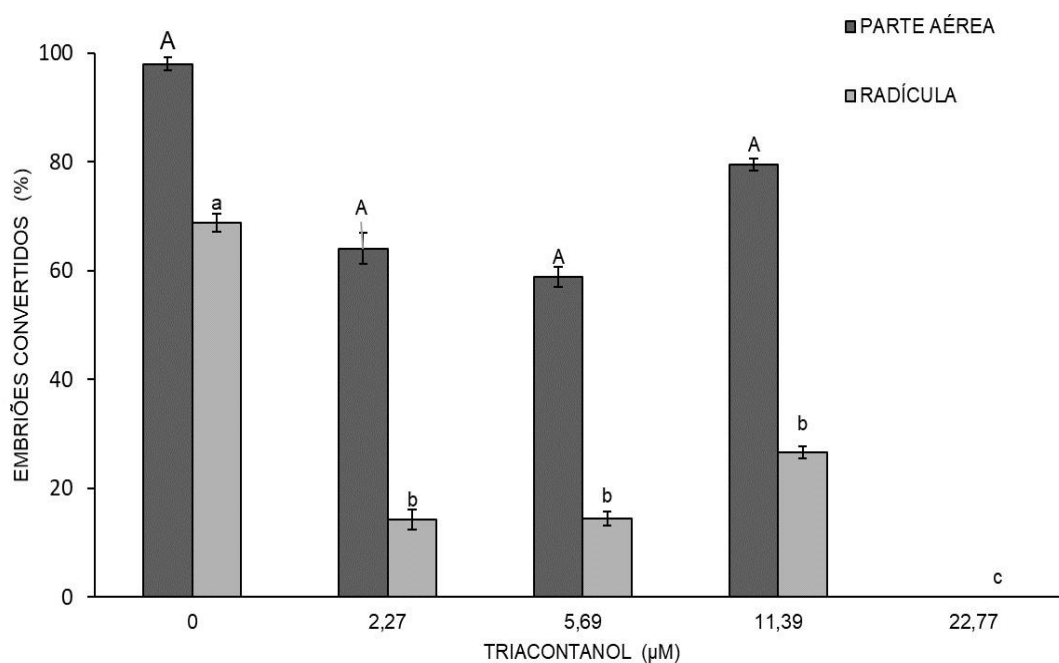
Triaccontanol ( $\mu$ M)	ES*	Viáveis (%)	ESS (%)
0	2,88 ns	84,03 ns	14,58 ns
2,27	1,44 ns	91,67 ns	54,17 ns
5,69	1,60 ns	76,25 ns	43,75 ns
11,39	1,96 ns	95,92 ns	40,82 ns
22,77	1,52 ns	85,53 ns	15,79 ns
CV(%)	20,49	16,87	27,12

Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores são a média de dois experimentos.

\* Número de embriões somáticos maduros por explante

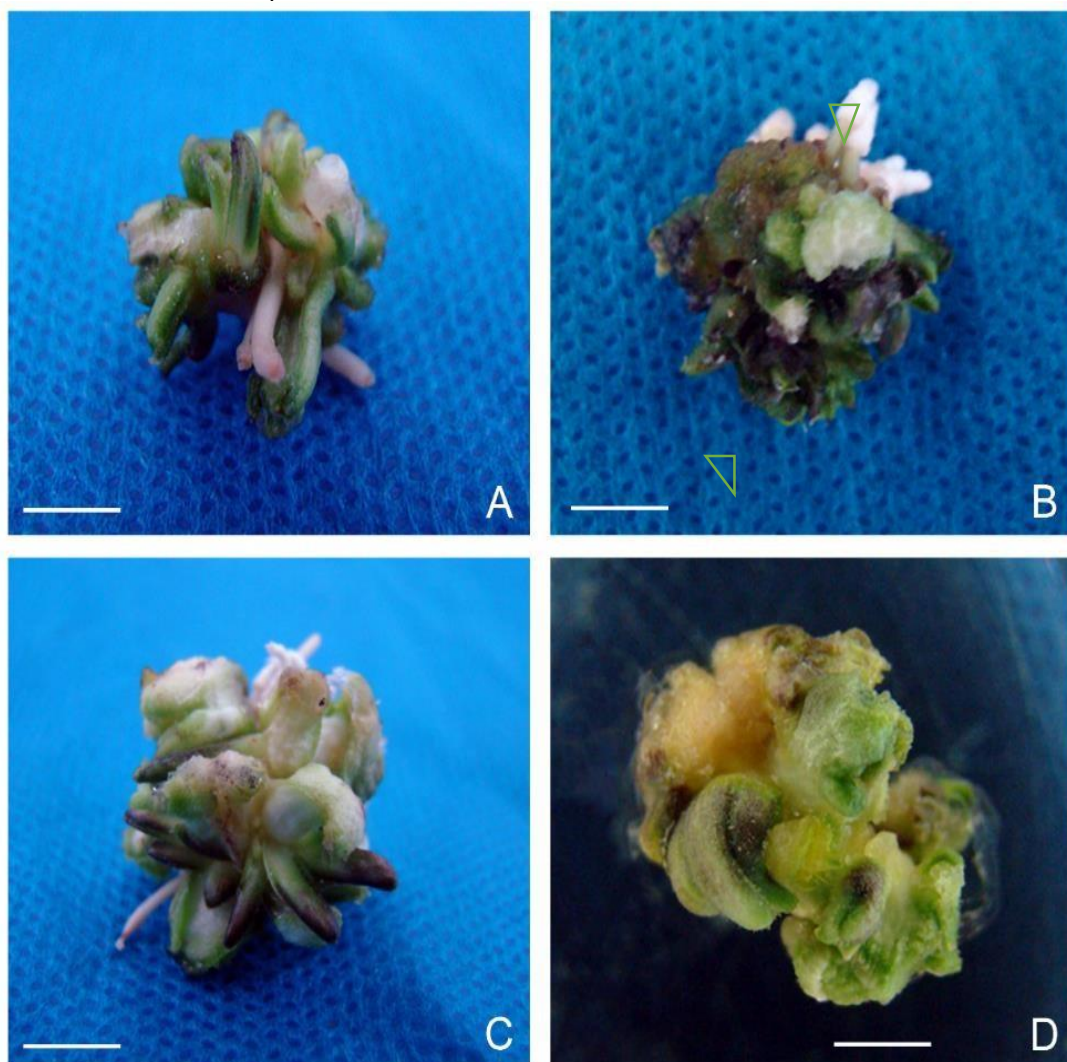
ESS: embriogênese somática secundária

FIGURA.6 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TRIACONTANOL ADICIONADO NO MEIO DE MATURAÇÃO SOBRE A CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* APÓS 30 DIAS EM MEIO DE CONVERSÃO.



O teste de Tukey à 5% de probabilidade foi realizado separadamente para a parte aérea e radicular.

FIGURA 7 - EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* KUNTH CONVERTIDOS APÓS 30 DIAS NO MEIO DE CONVERSÃO CONTENDO TRIACONTANOL. **A:** MATERIAL CONVERTIDO EM 2,27  $\mu$ M. BARRA= 4,3 mm **B:** MATERIAL CONVERTIDO EM 5,69  $\mu$ M. BARRA= 3,4 mm **C:** MATERIAL CONVERTIDO EM 11,39  $\mu$ M. BARRA= 5,6 mm **D:** MATERIAL CONVERTIDO EM 22,77  $\mu$ M. BARRA= 3,7 mm. PONTA DE SETA = HIPERHIDRICIDADE.



## 5. DISCUSSÃO

Durante a maturação, os embriões somáticos de pupunheira geralmente alongam e começam a formar o pecíolo cotiledonar (haustório), seguido da conversão, com a emissão da parte aérea e, por último, a emissão da radícula. A maioria deles demoram muito para emitir a primeira folha (cerca de dois meses) e ainda mais para emitir a parte radicular (cerca de três meses). Além disso, algumas anormalidades podem estar presentes, como embriões fusionados, ausência de raízes ou ausência da parte aérea. Esses problemas estão relacionados à maturação incompleta ou de baixa qualidade dos embriões somáticos, que limitam a sua conversão em plantas (AMMIRATO, 1987).

Quando comparada à glicose, a sacarose proporcionou maior número de embriões maduros, com quase todos apresentando coloração verde e com uma baixa taxa de embriogênese somática secundária que, na etapa de maturação, não é desejável, pois pode gerar plantas fusionadas e desincronizar a maturação e conversão. A sacarose é o carboidrato mais utilizado na cultura de tecidos vegetais, pois é considerado o melhor de todos, por ser a principal forma de carboidrato transportado na maioria das espécies. Esse fato é devido a sua melhor eficiência em armazenar energia, sua solubilidade em água (o amido não é solúvel) e sua menor reatividade quando comparada aos monossacarídeos (STRICKLAND, 1987). A concentração de sacarose de 30 gL<sup>-1</sup> resultou num maior número de embriões maduros e menor número de embriões secundários que as concentrações maiores. Da mesma maneira, Anandarajah e McKersie (1990) observaram que concentrações de sacarose superiores a 60 g L<sup>-1</sup> diminuíram o vigor e a taxa de conversão de embriões somáticos de alfafa.

Além da sacarose e glicose, outras formas de carboidratos estão disponíveis e oferecem melhores respostas de algumas espécies durante o cultivo *in vitro* ou em determinadas etapas da embriogênese somática. A adição de maltose, sorbitol e manitol no meio de cultura tem sido relatada promovendo a maturação de embriões somáticos em várias espécies (JAIN *et al.*, 1999; CORREDOIRA *et al.*, 2003). Os carboidratos desempenham

múltiplas funções nas células e são importantes na formação dos embriões somáticos. Nesse caso, eles são essenciais para a maturação, porque podem agir na osmoproteção das células embrionárias (HOEKSTRA *et al.*, 2001).

No presente trabalho, o tratamento com sorbitol diminuiu o número de embriões somáticos maduros. Entretanto, quando esse material foi transferido para o meio de conversão contendo sacarose, houve maior desenvolvimento de plântulas normais (com parte aérea e radicular) e menor ocorrência de plântulas fusionadas, quando comparado visualmente com o material convertido no meio contendo somente sacarose. O sorbitol pode atuar como agente osmótico num estágio inicial e depois é enzimaticamente convertido em açúcares redutores (glicose e frutose) que são fontes de carbono (GENG *et al.*, 2008). Além disso, o ajuste osmótico causado pelo sorbitol pode promover o crescimento do primórdio radicular (PUA; CHONG *et al.* 1984; KUMAR *et al.* 1999). Ahmad *et al.* (2007) também conseguiram um aumento no enraizamento de porta-enxertos de pessegueiro *in vitro*, usando sorbitol como fonte de carboidrato no meio de cultura. Uma maior formação de raízes e menor fusão das plântulas acelera a conversão e aclimatização das mudas, diminuindo custos operacionais.

Em relação ao tratamento com manitol, houve inibição do desenvolvimento dos embriões somáticos em todas as concentrações utilizadas. O manitol é um açúcar álcool produzido por algumas plantas como produto fotossintético primário e algumas plantas podem absorvê-lo do meio de cultura e metabolizá-lo (THOLAKALABAVI *et al.*, 1994; LIPAVSKÁ; VREUGDENHIL, 1996). O efeito negativo do manitol observado nesse trabalho pode ser devido à ineficiência da espécie em absorver o carboidrato ou metabolizá-lo, aliado ao estresse osmótico que o manitol pode causar sobre os explantes (JAIN *et al.*, 1997).

No presente trabalho foi observado que, na presença de PEG no meio de cultura, o número de embriões maduros diminuiu em relação ao controle, mas as plântulas convertidas apresentaram raízes bem formadas. O polietilenoglicol (PEG) é um polímero não plasmolizante de alto peso molecular que não é absorvido e gera estresse osmótico nas células vegetais (ATTREE *et al.*, 1995). Ele tem sido utilizado para melhorar a maturação e conversão

durante a embriogênese somática de várias espécies, promovendo a diferenciação normal dos meristemas apicais (ATTREE *et al.*, 1995; STASOLLA *et al.*, 2003; KAI *et al.*, 2009). Além disso, o estresse osmótico causado pelo PEG induz o acúmulo de substâncias de armazenamento e modifica a metilação do DNA, gerando plântulas normais (STASOLLA; YEUNG, 2003).

Não houve uma resposta positiva dos embriões somáticos de pupunha ao triacontanol durante a maturação e conversão, nas concentrações testadas. O triacontanol foi usado por vários autores como regulador de crescimento na cultura *in vitro*. Por exemplo, esse álcool primário aumentou a formação de tecido embriogênico e o enraizamento em três genótipos de *Pinus roxburghii* (MALABADI; NATARAJA, 2007). Em *Coffea arabica* e *C. canephora*, a adição de 4,55  $\mu\text{M}$  e 11,38  $\mu\text{M}$  de triacontanol ao meio influenciou positivamente a formação de embriões somáticos, assim como a embriogênese secundária (CIRIDHAR *et al.*, 2004).

## 6. CONCLUSÕES

Esse trabalho mostrou que a concentração de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose é indicada para a formação de um alto número de embriões somáticos maduros de pupunheira, e que o sorbitol e o PEG geram embriões somáticos bem individualizados, com bom desenvolvimento radicular, podendo ser utilizados na etapa de maturação. Também pode-se constatar que a pupunheira não metaboliza o manitol, já que os embriões não se desenvolveram e que o triacontanol não foi benéfico nas concentrações testadas e não deve ser utilizado nessas concentrações na etapa de maturação dos embriões somáticos de pupunha.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, T.; ABBASI, N.A.; HAFIZ, I.A.; ALI, A. Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF-677. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 4, p. 1269-1275, 2007.

AMMIRATO, P.V. **Organizational events during somatic embryogenesis**. In: GREEN, C.E.; SOMERS, D.A.; HACKETT, W.P. & BIESBOER D.D. (Eds.) *Plant Tissue and Cell Culture*. New York, Alan R. Liss, p. 57-81, 1987.

ANANDARAJAH, K.; McKERSIE, B. D. Enhanced vigor and dry somatic embryos of *Medicago sativa* with increased sucrose. **Plant Science**, v. 71, n. 2, p. 261-266, 1990.

ATTREE, S.M.; POMEROY, M.K.; FOLKE, L.C. Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage. **Journal of Experimental Botany**, v. 46, p. 433-439, 1995.

BOVI, M.L.A. **Palmito pupunha - Informações básicas para o cultivo**. Campinas: Instituto Agronômico, 1997. 11p. (Boletim Técnico, IAC).

BUSINGE, E.; BYGDELL, J.; WINGSLE, G.; MORITZ, T.; EGERTSDOTTER, U. The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. **Physiologia Plantarum**, v. 149, n. 2, p. 273-285, 2013.

CIRIDHAR, P.; INDU, E. P.; RAVISHANKAR, G. A.; CHANDRASEKAR, A. Influence of triacontanol on somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P ex Fr. **In vitro Cellular and Developmental BiologyPlant**, v. 40, p. 200-203, 2004.

CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. Somatic embryos originated from leaf explants. **Annals of Botany**, v. 92, p. 129-136, 2003.

GENG, P.P.; LA, H.G.; WANG, H.Q.; STEVENS, E.J.C. Effect of sorbitol concentration on regeneration of embryogenic calli in upland rice varieties (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 303-313, 2008.

GRAEFE, S.; DUFOUR, D.; VAN ZONNEVELD, M.; RODRIGUEZ, F.; GONZALEZ, A. Peach palm (*Bactris gasipaes*) in tropical Latin America: Implications for biodiversity conservation, natural resource management and human nutrition. **Biodiversity and Conservation**, v. 22, n. 2, p. 269–300, 2013.

HASSAN, M.; TAHA, R.A. Callogenesis, somatic embryogenesis and regeneration of date palm *Phoenix dactylifera* L. cultivars affected by carbohydrate sources. **International Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 5, p. 231-242, 2012.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n.9, p. 431-438, 2001.

JAIN, R.; DAVEY, M.; COCKING, E.; WU, R. Carbohydrate and osmotic requirements for high-frequency plant regeneration from protoplast-derived colonies of *indica* and *japonica* rice varieties. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n.3, p. 751, 1997.

JAIN, S.M.; GUPTA, P.G.; NEWTON, R.J. **Somatic embryogenesis in woody plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 5, 336 p., 1999.



KAI, M.K.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U. Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 121, p. 233–236, 2009.

KUMAR, A.; SOOD, A.; PALNI, L.M.S; GUPTA, A.K. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 57, p. 15-112, 1999.

LIPAVSKÁ, H.; VREUGDENHIL, D. Uptake of mannitol from the media by in vitro grown plants. **Plant Cell, Organ and Tissue Culture**, v. 45, p. 103-107, 1996.

MALABADI, R.; MULGUND, B.; NATARAJA, K. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord.) influenced by triacontanol. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, p. 531-537, 2005.

MALABADI, R.; NATARAJA, K. Influence of triacontanol on somatic embryogenesis of *Pinus roxburghii* Sarg. **Baltic Forestry**, v. 13, n.1, p. 39-44, 2007

MOREL, G.M., WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v. 38, p. 138–140, 1951.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PERÁN-QUESADA, R.; SÁNCHEZ-ROMERO, C.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. **Scientia Horticulturae**, v. 102, n. 1, p. 61-73, 2004.

PUA, E.C; CHONG, C. Requirement for sorbitol (D-glucitol) as carbon source for *in vitro* propagation of *Malus robusta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 1545-1549, 1984.

REDDY, B; CIRIDHAR, P; RAVISHANKAR, G The effect of triacontanol on micropropagation of *Capsicum frutescens* and *Decalepis hamiltonii* W&A. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, p. 253–258, 2002.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J.A.T.; SCHMILDT, O. Sucrose on *in vitro* rooting phase of papaya tree 'Tainung 01'. **Scientia Agraria**, v. 8, p. 25-31, 2007.

STASOLLA, C.; van ZYL, L.; EGERTSDOTTER, U.; CRAIG, D.; LIU, W.; SEDEROFF, R.R. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing whitespruce somatic embryos. **Plant Physiology**, v. 131, p. 4960, 2003.

STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 15–35, 2003.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 124-132, 2007a.

STEINMACHER, D. A.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, n. 1, p. 15- 22, 2007b.

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1463-1475, 2011.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic Embryogenesis in Peach Palm

Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. **Annals of Botany**, v. 100, n. 4, p. 699-709, 2007c.

STRICKLAND, S.G.; NICHOL, J.W.; MCCALL, C.M.; STUART, D.A. Effect of carbohydrate source on alfafa somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 48, p.113-121, 1987.

THOLAKALABAVI, A.; ZWIAZEK, J.J.; THORPE, T.A. Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations, and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoides* var. *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 30, p. 164-170, 1994.

TRACZ, A. L.; WENDLING, I.; KALIL-FILHO, A. N. SANTOS, A. F. dos; QUOIRIN, M. G. G. Enraizamento de perfilhos de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 67-73, 2009.

WALKER, D.R.; PARROT, W.A. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 55-62, 2001.

ZOUINE, J.; EL-HADRAMI. Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera* L: Effect of exogenous supply of sucrose on proteins, sugars, phenolics and peroxidases activities during the embryogenic cell suspension culture. **Biotechnology**, v. 3, p. 114-118, 2004.

## CAPÍTULO 2

**METABOLÔMICA NA CARACTERIZAÇÃO DA MATURAÇÃO DURANTE A  
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE PUPUNHA (*Bactris gasipaes* KUNTH.)**

## RESUMO

A embriogênese somática em *Bactris gasipaes* Kunth está bem estabelecida, mas a maturação, etapa crucial para a correta conversão dos embriões somáticos em plantas, ainda precisa ser melhorada. A análise dos metabólitos presentes nessa etapa permite uma melhor compreensão do processo e das respostas de uma espécie aos meios de cultura utilizados. O objetivo desse trabalho foi investigar o perfil metabólico dos embriões somáticos de pupunheira durante a maturação em diferentes meios de cultura, através da técnica da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Embriões somáticos de pupunha foram cultivados em meio de cultura de maturação contendo diferentes compostos (sacarose, glicose, PEG, sorbitol ou manitol) durante 45 dias. Para a análise em CG-EM, foram coletadas amostras 7, 14, 21 e 45 dias após a transferência para os meios de maturação. As amostras foram extraídas e injetadas no CG-EM, os cromatogramas gerados foram analisados e os metabólitos de maior peso foram identificados. Foi detectada a presença de açúcares e aminoácidos, muitos relacionados a respostas ao estresse osmótico, principalmente no meio com sorbitol e PEG. Também foi observado que no meio contendo sorbitol os embriões continham frutose e glicose aos 45 dias, permitindo maior disponibilidade de carboidratos ao longo do processo de maturação. No tratamento com manitol, os embriões somáticos não se desenvolveram, devido à inabilidade das plantas em metabolizar o composto. O perfil dos metabólitos mostrou que o sorbitol e o PEG adicionados aos meios de cultura induziram respostas ao estresse osmótico que promoveram uma melhor individualização e formação de raízes nos embriões somáticos e podem ser adicionados ao meio de maturação para otimizar o protocolo de embriogênese somática.

Palavras-chave: carboidratos, cromatografia gasosa, estresse osmótico.

## ABSTRACT

Somatic embryogenesis in *Bactris gasipaes* Kunth is well established, but the maturation, that is a crucial step for correct somatic embryos conversion into suitable plants, still needs improvement. The analysis of the metabolites present in the plant tissue during this step allows a better understanding of the process and of the responses of plant tissues to the culture medium. The objective of this study was to investigate the metabolic profile of peach palm somatic embryos during maturation in different culture media, using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Peach palm somatic embryos were cultured in maturation medium supplemented with different compounds (sucrose, glucose, PEG, sorbitol or mannitol) for 45 days. For GC-MS analysis, samples were collected at 7, 14, 21 and 45 days after transfer to the maturation media. The samples were extracted and injected into GC-MS to separate the metabolites. The chromatograms generated were analyzed and the major metabolites were identified. The relevant metabolites for each treatment were selected and discussed. The presence of sugars and amino acids was detected, many related to responses to osmotic stress. It was also observed that the somatic embryos cultured in medium containing sorbitol contained fructose and glucose after 45 days, showing higher availability of carbohydrates throughout the maturation process. In treatment with mannitol, somatic embryos did not develop due to inability of plants to metabolize the compound. The metabolic profile showed that sorbitol and PEG addition into the culture medium induced osmotic stress responses that promote better somatic embryo individualization and root formation and could be added to maturation medium for somatic embryogenesis protocol optimization.

Keywords: carbohydrates, gas chromatography, osmotic stress,

## 1.INTRODUÇÃO

A regeneração de plantas através da embriogênese somática é uma ferramenta importante para a produção rápida e em grande escala de mudas clonais, que pode ser utilizada para a micropropagação de variedades selecionadas e usadas em programas de melhoramento (JAIN *et al.*, 2011). A técnica consiste na indução de células embriogênicas a partir de tecidos somáticos, que tem a habilidade de proliferar e regenerar embriões, passando por diferentes estágios de desenvolvimento similares aos da embriogênese zigótica (ZIMMERMAN, 1993).

A aplicação da embriogênese somática possibilita a superação de barreiras e dificuldades encontradas na propagação convencional de espécies recalcitrantes. Apesar das vantagens do processo, como a alta taxa de multiplicação clonal e a possibilidade da produção em larga escala em biorreatores, alguns problemas são encontrados em várias espécies, como falhas na maturação e baixa taxa de conversão dos embriões somáticos em plantas normais (VIANA *et al.*, 1999; ARA *et al.*, 2000)

A maturação é uma etapa importante para o sucesso dos protocolos de embriogênese somática, que deve levar a uma conversão adequada, gerando mudas saudáveis. O acúmulo adequado de reservas, como carboidratos, amido e proteínas, durante a maturação dos embriões somáticos, pode levar à obtenção de plântulas vigorosas, facilitar a aclimatização e o desenvolvimento *ex vitro* das mudas geradas (ATTREE *et al.* 1992; CHANPRAME, *et al.*, 1998). Neste sentido, o estudo dos compostos presentes nos tecidos durante a maturação torna-se uma ferramenta fundamental para a compreensão das respostas da espécie às alterações do meio de cultura (GORBATENKO; HAKMAN, 2001).

Na pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), protocolos de embriogênese somática envolvem a indução de culturas embriogênicas e embriões somáticos, com uso do Picloram com diferentes fontes de explantes (STEINMACHER *et al.*, 2007a, 2007b, 2007c); a manutenção em culturas cíclicas através da embriogênese somática secundária em meio sólido (STEINMACHER *et al.*, 2011) ou com uso de um sistema de imersão

temporária (HERINGER *et al.*, 2014), a maturação, com uso do ácido abscísico (ABA), seguido da conversão em meio de cultura sem reguladores (HERINGER *et al.*, 2014). Apesar dos protocolos gerarem mudas que foram aclimatizadas com sucesso, o processo de embriogênese somática está aquém de ser compreendido totalmente.

Entre os métodos disponíveis para um melhor entendimento da fisiologia e metabolismo de uma espécie está a metabolômica, que tem por princípio a análise do perfil de metabólitos de uma espécie, uma vez que estes compostos desempenham importante papel nas diferentes vias do metabolismo celular, já que sua quantidade dentro de uma célula ou tecido é determinada pela concentração e pelas propriedades das enzimas. Portanto, a quantidade de metabólitos representa uma informação integrativa da função molecular celular que define uma característica fenotípica em resposta a alterações ambientais ou genéticas (FIEHN, 2002; VILLAS-BOAS; GOMBERT, 2006).

A obtenção de um perfil metabólico normalmente é feita através de técnicas cromatográficas ou por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), sendo a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) amplamente difundida (FIEHN, 2002; SCHAUER *et al.*, 2006). A CG-EM é uma das metodologias mais utilizadas para analisar o perfil metabólico de amostras biológicas, sendo uma ferramenta valiosa para identificar e quantificar metabólitos em diferentes etapas da embriogênese somática. Além disso, pode ser utilizada para avaliar, ao nível metabólico, as alterações causadas por variações na composição do meio de cultura em determinada etapa do processo (SUMNER *et al.*, 2003; BUNDY; DAVEY, 2009; BUSINGE *et al.*, 2012).

Para aproveitar o potencial completo da embriogênese somática como técnica de propagação, uma melhor compreensão do desenvolvimento do embrião somático é necessária. Quanto mais se sabe sobre o desenvolvimento embrionário e sobre seus mecanismos regulatórios, mais precisos serão os protocolos de cultivo, podendo suportar uma propagação em larga escala através da embriogênese somática.



## 2. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi investigar o perfil metabólico dos embriões somáticos de *Bactris gasipaes* durante o processo de maturação na embriogênese somática e relacionar as alterações no perfil metabólico às diferentes fontes de carbono e agentes osmóticos adicionados ao meio de maturação.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 ORIGEM DO MATERIAL EMBRIOGÊNICO E EXPERIMENTOS DE MATURAÇÃO

As culturas embriogênicas utilizadas para produção de embriões somáticos foram obtidas de embriões zigóticos excisados de sementes de plantas de pupunha lisa. As sementes foram descascadas e lavadas e, em condições assépticas, o material foi desinfestado com álcool 70% por 5 minutos e com uma solução de hipoclorito de sódio 10% adicionada de Tween 20® (0,1% v/v) por 20 minutos seguido de três lavagens com água deionizada esterilizada.

O meio de cultura de indução consistiu dos sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e vitaminas de Morel (MOREL; WETMORE, 1951), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5 g L<sup>-1</sup> de glutamina, 10 µM de Picloram, 1 µM de nitrato de prata e 2,5 g L<sup>-1</sup> de Gelzan (Sigma-Aldrich®). Os embriões foram retirados com ajuda de pinça e bisturi, sendo imediatamente inoculados em placas de Petri contendo aproximadamente 30 ml de meio de cultura de indução. As placas de Petri foram mantidas em sala de crescimento, no escuro, por aproximadamente 12 semanas, até o aparecimento de massas embriogênicas e embriões somáticos globulares.

Os embriões somáticos globulares obtidos foram repicados para um meio de manutenção e multiplicação, igual ao meio de indução, com adição de 1 g L<sup>-1</sup> de glutamina, e transferidos para meio fresco a cada 45 dias, sempre sendo mantidos no escuro.

Para a maturação, um grupo contendo embriões somáticos com  $20 \pm 10$  mg de massa fresca e aproximadamente 3 mm de diâmetro foi utilizado como explante inicial. Os compostos selecionados para avaliar o efeito no perfil metabólico dos embriões somáticos em maturação foram sacarose, glicose, sorbitol, manitol e PEG, totalizando cinco tratamentos. O meio de base era composto dos sais do MS, vitaminas de Morel, suplementado com  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de glutamina e  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  de Gelzan (Sigma-Aldrich®). A esse meio foram adicionados separadamente  $30 \text{ g.L}^{-1}$  dos compostos selecionados, com exceção do PEG, que foi adicionado na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  em um meio contendo  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. O cultivo foi mantido em sala de crescimento, sob lâmpadas fluorescentes brancas frias de intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16h e temperatura de  $25 \pm 3^\circ \text{C}$ , durante 45 dias.

### 3.2 EXTRAÇÃO E ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

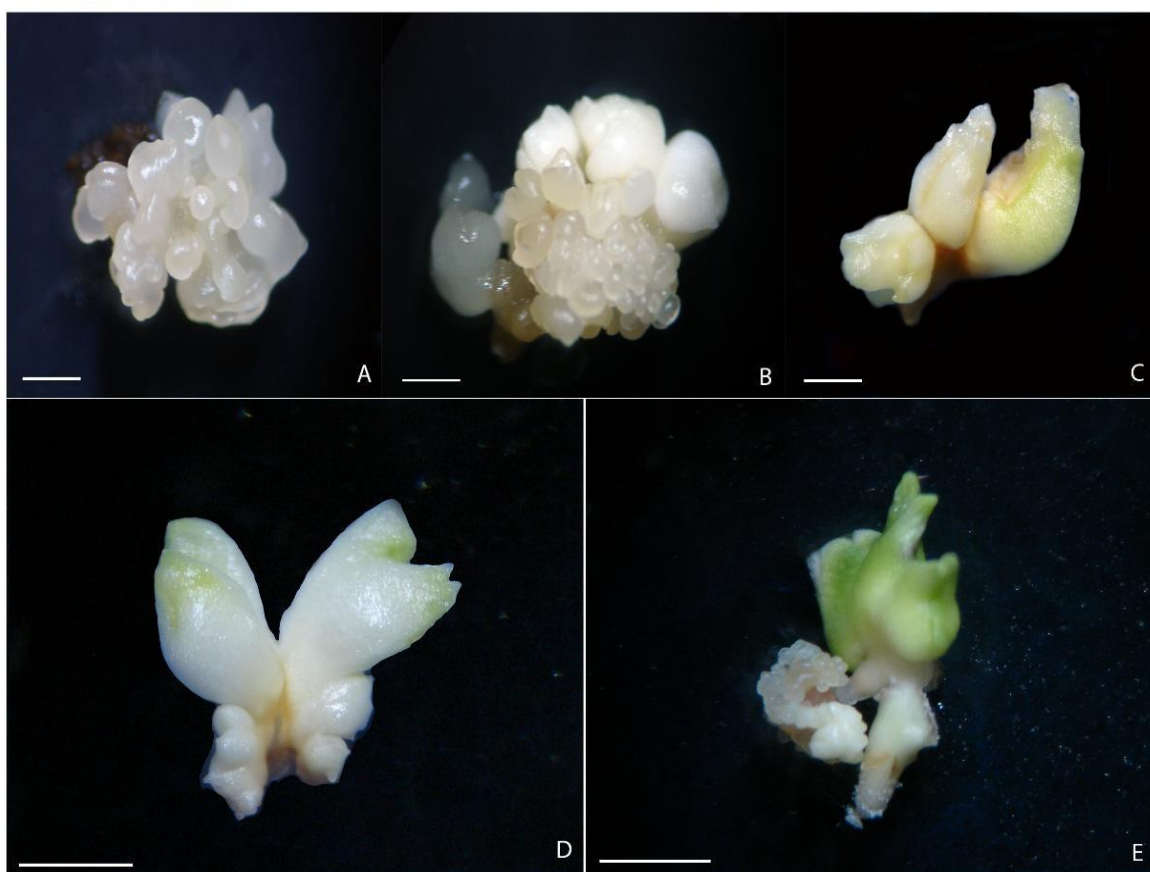
Dez grupos de embriões somáticos de cada um dos cinco tratamentos de maturação foram coletadas depois de 7, 14, 21 e 45 dias após a transferência para os meios de cultura de maturação (FIGURA 1) e imediatamente congeladas a  $-80^\circ \text{C}$ . As amostras foram maceradas e homogenizadas em nitrogênio líquido e então 10 mg foram colocados em um tubo de Eppendorf de 2 ml com  $18 \mu\text{L}$  de ribitol (padrão interno:  $1 \text{ mg/ml}$ ) e  $1,5 \text{ mL}$  de metanol para a extração. As amostras foram mantidas a  $70^\circ \text{C}$  por 15 minutos seguido de uma centrifugação por 3 minutos a  $12.000 \text{ rpm}$ . O sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio de 5 ml e foram adicionados  $1,5 \text{ mL}$  de água ultrapura e  $0,75 \text{ mL}$  de clorofórmio. A solução foi agitada por 1 minuto em um vórtex e depois centrifugada por 15 min a  $4000 \text{ rpm}$ . A fração sobrenadante ( $700 \mu\text{L}$ ) foi separada em tubos limpos e evaporada sob vácuo em um SpeedVac (Concentrador plus – Eppendorf) por 10 horas (FIEHN *et al.*, 2000). Todas as amostras foram feitas em triplicata.

Para a análise em cromatografia gasosa, foram adicionados ao extrato seco  $50 \mu\text{L}$  de uma solução contendo 20 mg de hidrocloreto de metoxiamina

diluído em 1 mL de piridina para metoximação, a qual foi realizada à 40° C por 90 minutos. Após, 50 µL de MSTFA (N-metil-N-trimetilsilil-trifluoracetamida) foram adicionados sobre a solução anterior para sililação dos compostos, que ocorreu a 40°C por 90 minutos.

A análise cromatográfica dos padrões derivatizados foi feita usando injeção automática em um cromatógrafo gasoso acoplado à um espectrofotômetro de massa (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu). As amostras foram injetadas (1 µL) com uma divisão de fluxo de 1:25 e separadas através de uma coluna cromatográfica apolar (30m x 0,32 mm x 0,25 µm) com a fase estacionária 5%-fenil-metilpolisiloxano Rtx-5 (Restek).

FIGURA 1. - MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* KUNTH. A: MATERIAL EMBRIOGÊNICO. B. APÓS 7 DIAS EM MEIO DE MATURAÇÃO. C. 15 DIAS EM MEIO DE MATURAÇÃO. D: 21 DIAS EM MEIO DE MATURAÇÃO. E: 15 DIAS EM MEIO DE CONVERSÃO. BARRAS A= 0,9 MM; B= 1,2; C= 1,4; D= 6,12 MM; E= 7,21 MM.



### 3.3 TRATAMENTO PÓS ANÁLISES

Os cromatogramas gerados pelo software foram deconvoluídos no software AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution, NIST). Os metabólitos polares foram identificados por espectro de massa, comparando tempo de retenção com padrões e através dos seus índices de retenção (IR) (MSRI, 2012; SCHAUER *et al.*, 2006). Os valores de IR foram calculados com base na análise de uma mistura de hidrocarbonetos contendo alcanos lineares saturados com de carbonos entre C<sub>7</sub> – C<sub>30</sub> (VAN DEN DOLL; KRATZ, 1963).

A identificação dos constituintes ocorreu mediante comparação com padrões, análise dos espectros de massas e determinação do índice de retenção (IR), comparado com uma biblioteca internacional (GOLM database) de metabólitos, que se encontra aberta e disponível para consulta (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/> - Golm database).

A identificação de muitos metabólitos durante a análise torna a quantificação um processo árduo e muitas vezes impraticável. Para contornar esse problema, os metabólitos podem ser apresentados de forma “semi” quantitativa. Inicialmente foram selecionados os picos relevantes através do sinal ruído (s/r), no qual somente aqueles compostos com s/r acima de 75 foram integrados. Para a inclusão ou exclusão de compostos dentro de um tratamento, foram analisadas as triplicatas, excluindo os compostos que apareciam em somente uma delas e calculando a média quando aparecia em duas, substituindo os dados faltantes.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram transformados para  $-\log_{10}$  e analisados por componentes principais (PCA) para reduzir a dimensão dos dados quando da comparação dos diferentes experimentos após 45 dias no meio de maturação, utilizando o software Unscrambler 10. A média e o desvio padrão das triplicatas foram analisados através de análise de variância (ANOVA com Bonferroni) usando o software Graph Pad Prism 5. Na tentativa de buscar os metabólitos que apresentaram maior peso na separação entre os dias das coletas em cada

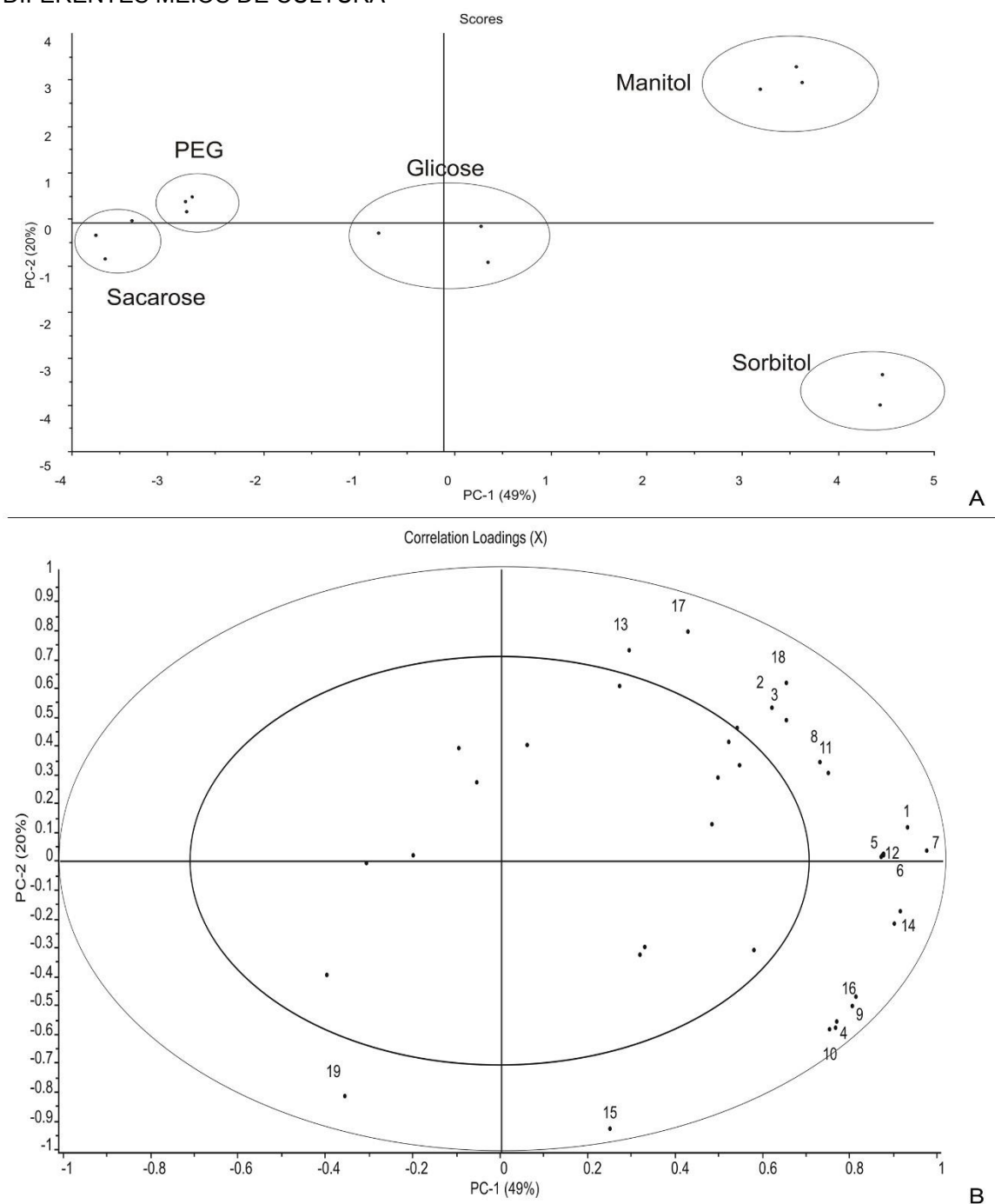
tratamento, os dias de coletas foram considerados como uma variável dependente (Y) enquanto que os metabólitos representavam as variáveis independentes (X) (termos usados no modelo de regressão tradicional). Através da regressão parcial dos mínimos quadrados (PLS – do inglês *partial least squares*) uma relação empírica (Y, X) foi estabelecida através de uma calibração multivariada. Após a regressão os metabólitos com alta correlação com 45 dias e aqueles com simetricamente oposto, baixa correlação. Todos os metabólitos selecionados tiveram suas significâncias comprovadas por teste-t independente.

#### 4 RESULTADOS

Na análise de PCA, os metabólitos com maiores valores de carga são indicados com maior influência sobre as respectivas características de um dos componentes (SUMNER *et al.*, 2003). Nesse trabalho, o PCA identifica os elementos (metabólitos) que mais contribuem para cada tratamento. Os metabólitos com maiores valores de carga são indicados como tendo a mais forte influência na separação dos tratamentos e estão indicados numericamente na Figura 2. O PC-1 explicou 49% do sistema e separou o tratamento com sorbitol e com manitol daqueles com PEG e sacarose. PC-2 com 20% do sistema explicado separou o tratamento com manitol do tratamento com sorbitol.

Os metabólitos dos embriões somáticos de *Bactris gasipaes* nas diferentes condições de maturação e com alta influência no modelo (i, e. entre as duas elipses, FIGURA 2) são compostos de diferentes classes químicas como carboidratos, aminoácidos e ácidos (TABELA 1).

FIGURA 2 SCORES DOS TRATAMENTOS (A) E CONJUNTO DE COMPOSTOS (B) NOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* APÓS 45 DIAS DE MATURAÇÃO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA



Os embriões somáticos tratados com sorbitol apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,5$ ) em relação a concentração de frutose e glicose, sendo esta maior aos 45 dias, quando comparada aos outros tratamentos. A concentração de sacarose foi de  $5,67 \mu\text{g/g}$  nos ES cultivados na presença de sorbitol, não diferindo somente do tratamento com sacarose ( $2,48 \mu\text{g/g}$ ). Aos

45 dias, a concentração de manitol foi maior no tratamento com manitol do que nos outros tratamentos (TABELA 1). Em relação aos aminoácidos identificados, observou-se a presença de serina e isoleucina nos embriões somáticos cultivados na presença de sacarose e PEG, aos 45 dias.

TABELA 1. COMPOSTOS ENCONTRADOS NO EXTRATO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* APÓS 45 DIAS DE MATURAÇÃO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

ID	IR	Composto	Tratamentos				
			Sacarose*	Glicose*	PEG*	Sorbitol*	Manitol*
1	1084,9	n.i.	0,0038 a	0,0066 a	0,0044 a	-	-
2	1097,2	n.i.	0,0509 b	0,0583 b	0,0406 b	0,0733 b	0,4547 a
4	1137,0	n.i.	0,3384 b	1,1796 ab	0,2821 b	1,0028 b	2,6467 b
5	1210,8	n.i.	0,01403	-	0,0142	-	-
6	1254,2	Serina	0,01388	-	0,0249	-	-
7	1304,6	Isoleucina	0,00733	-	0,0066	-	-
8	1323,4	n.i.	0,0068 b	0,0111 b	0,0078 b	-	0,0246 b
9	1368,0	n.i.	0,0353 b	0,0298 b	0,0458 b	0,4418 a	-
10	1439,2	n.i.	0,0480	-	0,0477	-	-
11	1541,3	n.i.	0,05078 a	0,0671 a	0,0425a	0,0349 a	0,1415 a
12	1950,6	Frutose	0,01278 b	0,4291 b	0,1706 b	10,2729 a	0 b
13	1980,8	Glicose	0,0725 b	0,3413 b	0,1824 b	13,0489 a	0,0159 b
14	2243,1	Manitol	0,0652 b	0,1835 b	-	0,1342 b	24,8399 a
15	2253,5	Inositol	0,0192 b	0,0225 b	0,0627 b	0,0916 a	-
16	2728,2	Sacarose	2,4805 ab	0,7808 b	1,8081 b	5,6686 a	0,0918 b

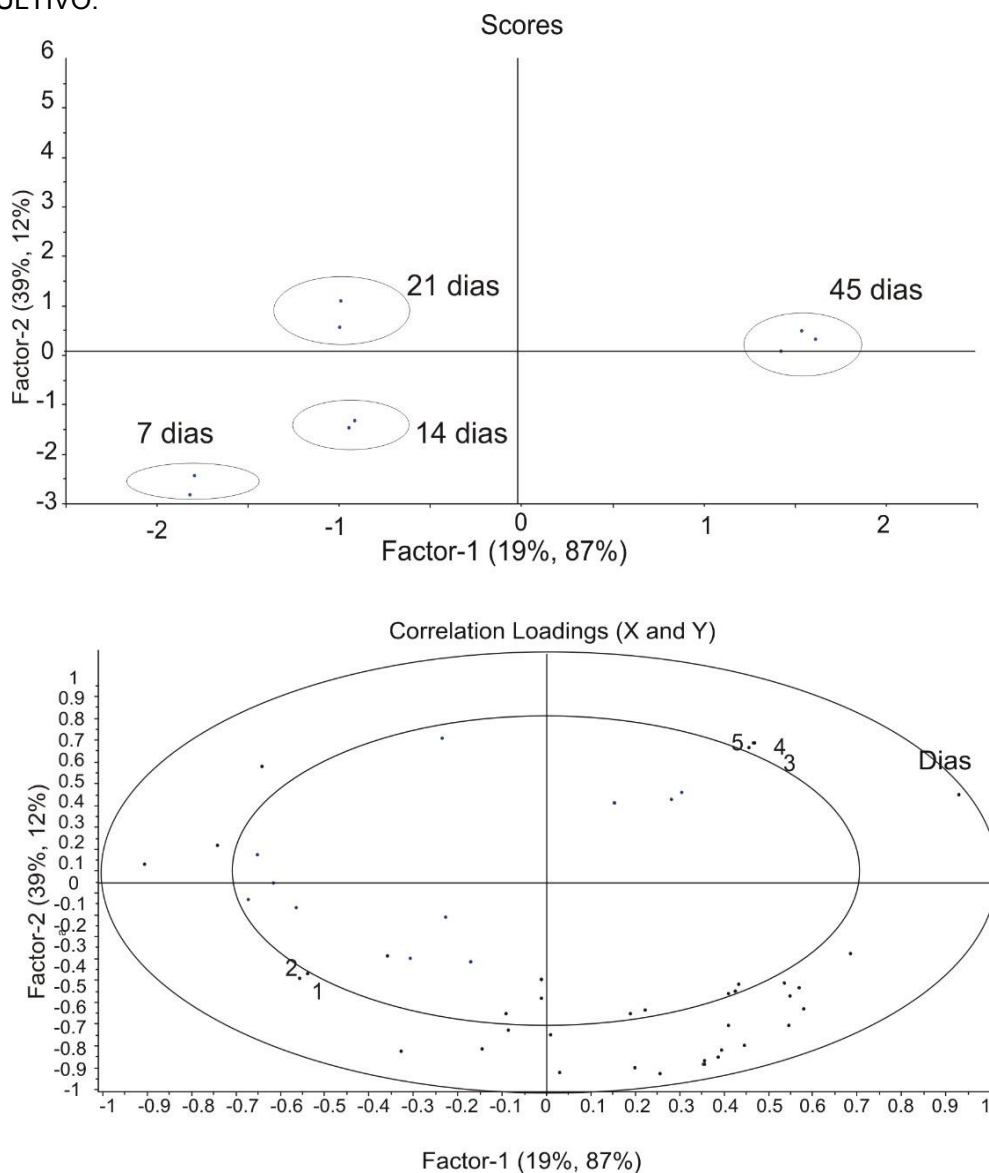
\* Valores em µg/g.

As letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas em 95% de probabilidade através da ANOVA com Bonferroni. n.i.: não-identificado ID: número do composto, IR: índice de retenção

Na análise de PLS, o modelo gerado calibrou todos os experimentos com respeito ao tempo de cultivo (7 – 45 dias APÊNDICES 17-21). No tratamento com sacarose (FIGURA 3) foi observado no Fator 1 (97% de variância explicada) a separação do tempo 45 dias das outras três datas de coletas e no fator 2 foi separado o 21º e 45º dia das outras datas. As variáveis com correlação positiva com 45 dias (quadrante esquerdo superior) e negativa (correlação positiva com 7 dias, quadrante direito inferior) determinaram os

compostos significativos (numerados na Figura 3), os quais foram descritos na Tabela 2.

FIGURA 3 ANÁLISE DE REGRESSÃO PLS DOS METABÓLITOS PRESENTES EM *Bactris gasipaes* KUNTH NO MEIO DE MATURAÇÃO COM SACAROSE ENTRE 7 E 45 DIAS DE CULTIVO.

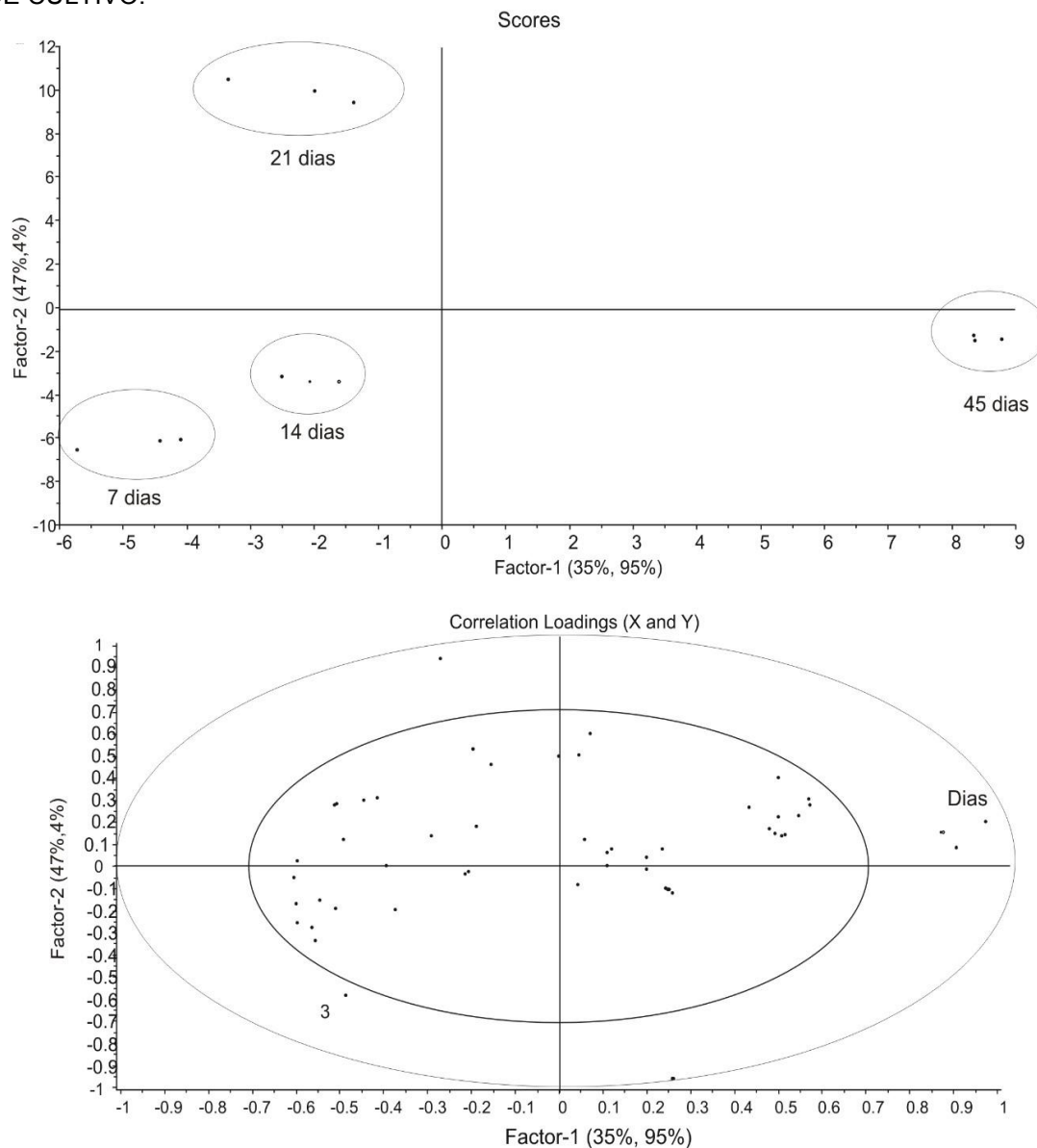


No caso da glicose (FIGURA 4), foi observado, no Fator 1 (95% de variância explicada), a separação do tempo 45 dias das outras três datas de coletas e, no fator 2, foi separado o 21º dia das outras datas. As variáveis com correlação positiva com 45 dias (quadrante esquerdo superior) e negativa (correlação positiva com 7 dias, quadrante direito inferior) determinaram os



compostos significativos (numerados na Figura 4), os quais foram descritos na Tabela 2.

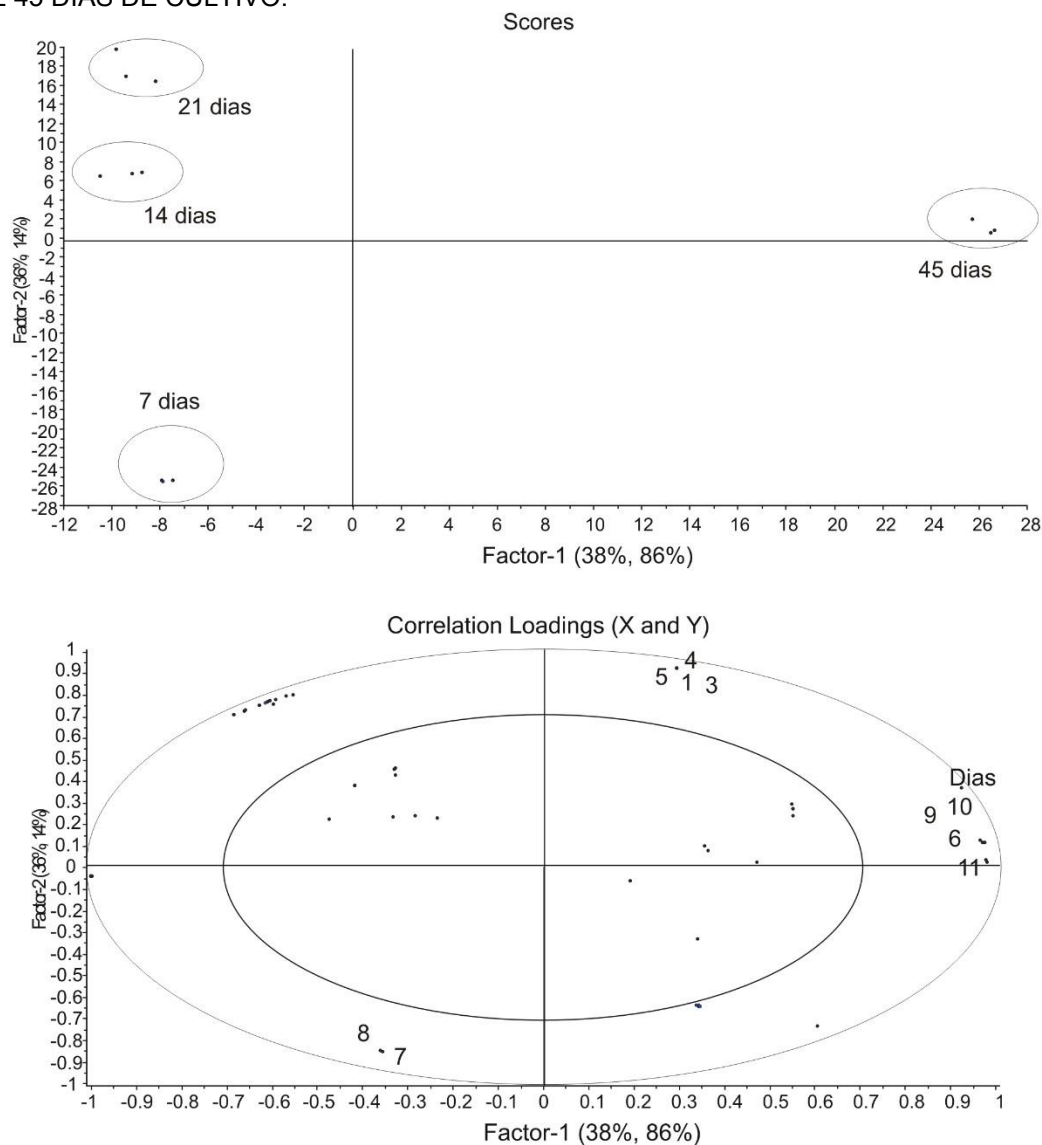
FIGURA 4. ANÁLISE DE REGRESSÃO PLS DOS METABÓLITOS PRESENTES EM *Bactris gasipaes* KUNTH NO MEIO DE MATURAÇÃO CONTENDO GLICOSE ENTRE 7 E 45 DIAS DE CULTIVO.



Para o tratamento com PEG (FIGURA 5), foi observado, no Fator 1 (86% de variância explicada), a separação do tempo 45 dias das outras três datas de coletas e, no fator 2, foi separado o 7º dia das outras datas. As variáveis com correlação positiva com 45 dias e negativa determinaram os compostos significativos (numerados na Figura 5), os quais foram descritos na Tabela 2.

Os compostos identificados foram o ácido benzóico, valina, isoleucina e glicose para os 7 dias e inositol e mio-inositol para os 45 dias de maturação (TABELA 2).

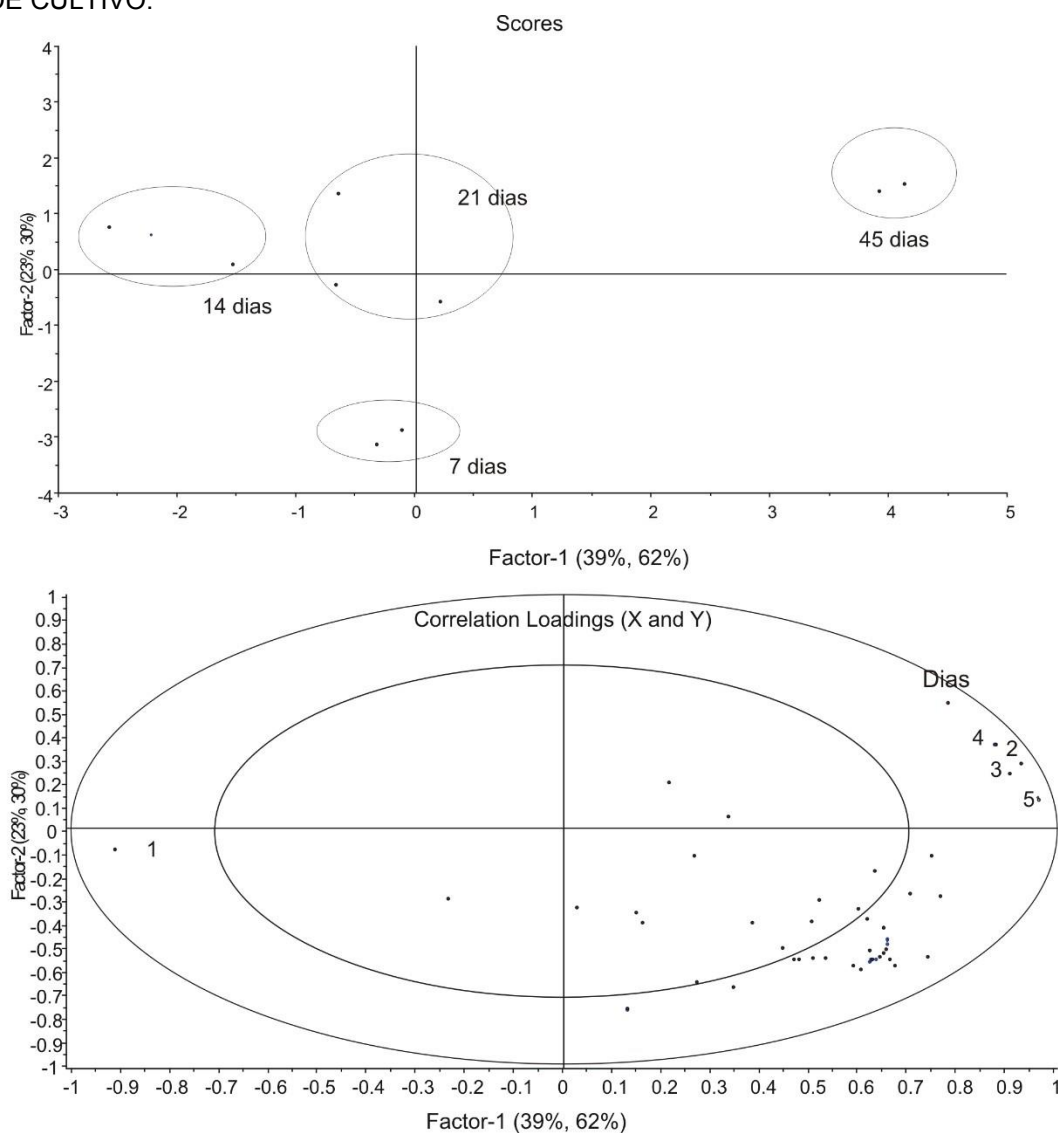
FIGURA 5. ANÁLISE DE REGRESSÃO PLS DOS METABÓLITOS PRESENTES EM *Bactris gasipaes* KUNTH NO MEIO DE MATURAÇÃO CONTENDO POLIETILENOGLICOL ENTRE 7 E 45 DIAS DE CULTIVO.



No tratamento com sorbitol (FIGURA 6), foi observado, no Fator 1 (62% de variância explicada), a separação do 45º dia do 7º e 14º dia de coleta e, no fator 2, foi separado o 14º e 45º dia das outras datas. As variáveis com correlação positiva com 45 dias e negativa determinaram os compostos significativos (numerados na Figura 6), os quais foram descritos na Tabela 2.

Os metabólitos identificados foram a frutose e o ácido-1-pirrolino-3-hidroxi-5carboxílico, além de polióis não identificados.

FIGURA 6.- ANÁLISE DE REGRESSÃO PLS DOS METABÓLITOS PRESENTES EM *Bactris gasipaes* KUNTH NO MEIO DE MATURAÇÃO CONTENDO SORBITOL ENTRE 7 E 45 DIAS DE CULTIVO.



Para o tratamento com manitol (FIGURA 7), a análise separou, no Fator-1 (71% de variância explicada), o 7º e 14º dia do 21º e 45º dia e, no fator-2, o 7º e 45º dia do 14º dia. As variáveis com correlação positiva e negativa em relação aos 45 dias determinaram os compostos significativos (numerados na Figura 7) e descritos na Tabela 2.

FIGURA 7. ANÁLISE DE REGRESSÃO PLS DOS METABÓLITOS PRESENTES EM *Bactris gasipaes* KUNTH NO MEIO DE MATURAÇÃO CONTENDO MANITOL ENTRE 7 E 45 DIAS DE CULTIVO.

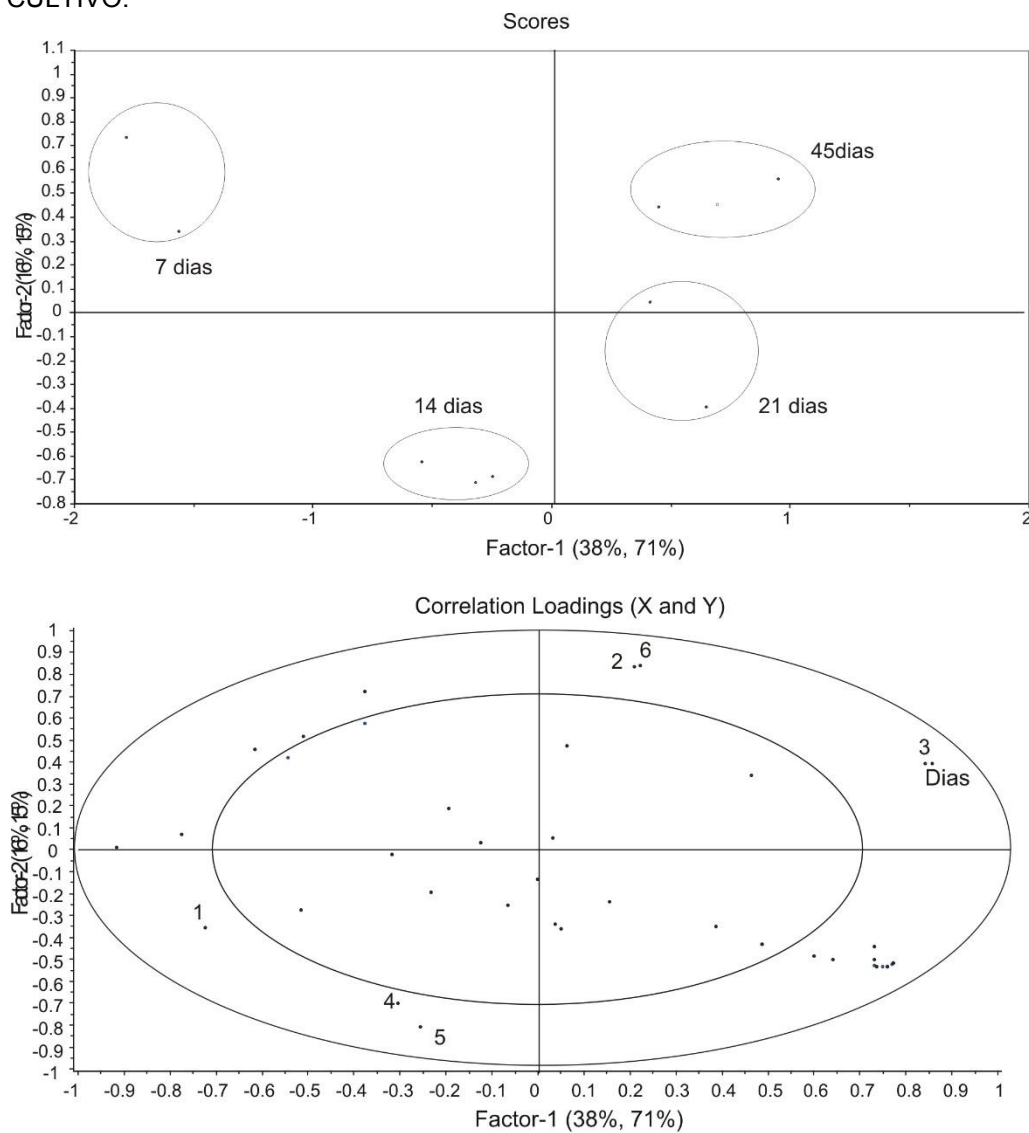


TABELA 2. METABÓLITOS REPRESENTATIVOS DOS 7º E 45º DIAS DE MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* KUNTH.

ID	IR	Composto	m/z		7 dias		45 dias
SACAROSE							
1	1314.8	Glicina	86	174	248	0	0,111
2	1507.5	Ácido piroglutâmico	73	147	156	0	0,07329
3	1147.1	Isoleucina	86	146	188	0,1866	0
4	1227.9	Ácido Benzoico	105	135	179	5,8065a	0,277b
5	1762.7	Putrescina	130	174	214	0,3824	0
6	2813.2	Dissacarídeo	73	204	217	0	0,0866
7	2957.6	Maltose	204	217	319	0	0
GLICOSE							
1	2813.2	Dissacarídeo	73	204	217	0,943892b	25,40345a
2	2826.3	Dissacarídeo				0,943892b	25,38812a
3	2951.5	Maltose	204	217	319	0,511647b	2,774959a
POLIETILENOGLICOL							
2	1081.6	Valina	72	75	146	0,098	0
3	1147.1	Isoleucina	86	146	188	0,14	0
4	1227.9	Ácido benzoico	105	135	179	0,062	0
5	1541.3	n.i.	263	-	-	0,16	0
6		Glicose	204	217	-	0,92	0
7	2139.0	Açúcar-álcool	204	217	319	0	0,034
8	2152.5	Inositol	217	305	318	0	0,155
9	2768.8	Dissacarídeo	73	147	217	0,17	0
10	2813.2	Dissacarídeo	73	204	217	0,085	0
11	2826.3	Dissacarídeo	73	147	204	0,085	0
SORBITOL							
1	1507.5	Ácido 1-pirrolino-3hidroxi-5-carboxílico	156	-	-	0	0,374217
2	1791.0	Açúcar álcool	73	147	217	26,29758	0
3	1935.9	Açúcar álcool	73	147	217	1,410681	0
4	1937.0	n.i.	73	217	307	24,61277	0
5	1950,6	Frutose	205	217	319	37,935 a	0,353 b
MANITOL							
1	RI=1049.9	Ácido láctico	73	117	147	0	0,559
2	RI=1280.9	Etanolamina	86	100	174	2,82	0
3	RI=1578.5	Asparagina	116	130	159	0	0
4	RI=1791.0	Açúcar álcool	73	147	217	2,226 b	3,337 a
5	RI=2032.8	Açúcar	73	147	205	2,809	0
6	RI=2241.6	Ácido octadecanóico	73	117	341	1,189 a	0,977 b

n.i. – não identificado ID: identificação; IR: índice de retenção; m/z: massa/carga Letras diferentes na linha indicam representam diferenças no teste T ( $p < 0,05$ )

## 5. DISCUSSÃO

A maturação se inicia com o desenvolvimento do embrião somático, passando por estádios de diferenciação até começar o processo de conversão. Os carboidratos utilizados nessa etapa regulam a expressão genética e o ambiente osmótico, podendo ativar genes relacionados à síntese de proteínas de reserva (proteínas LEA – *later embryogenesis abundant*-, desidrinas, globulinas e albuminas) (BUSINGE *et al.*, 2013), entre outras.

Na embriogênese zigótica, a etapa de maturação é marcada pelo acúmulo de metabólitos de reserva, seguido da desidratação do embrião zigótico. Para a correta maturação ocorrer, os embriões devem atingir a maturidade morfofisiológica, o que garante uma boa performance pós embrionária (STASOLLA; YEUNG, 2003).

Nos embriões somáticos de pupunheira obtidos no presente trabalho foram observados a presença predominante de carboidratos aos 45 dias de maturação, podendo ser justificada pela participação desses compostos em diversos processos biológicos. Também foi verificada a presença de vários aminoácidos que não apresentaram diferenças na quantidade entre os tratamentos. Dentro do metabolismo celular, os aminoácidos são, principalmente, intermediários na formação de outros compostos, principalmente de proteínas e hormônios relacionados, dentre outras coisas, com o crescimento e distribuição de nutrientes na planta (TAIZ, ZEIGER, 2017).

Os embriões somáticos cultivados em meio contendo sorbitol apresentaram uma alta concentração de glicose e frutose aos 45 dias de maturação, maior que no meio com sacarose e glicose. Isso se deve ao fato de que os embriões somáticos absorvem o sorbitol e o convertem em glicose ou frutose para utilização nos processos metabólicos. A enzima responsável pela hidrólise do sorbitol em glicose é a sorbitol oxidase, e a do sorbitol em frutose a sorbitol desidrogenase - SDH (AGUAYO *et al.*, 2013), ambas provavelmente presentes na pupunha. A SDH está presente no endosperma de sementes de *Zea mays* L. e de outras monocotiledôneas e está relacionada à síntese de amido, ao balanço energético e também à nutrição do embrião

zigótico (SOUZA *et al.*, 2008; JIA, *et al.*, 2015). Além disso, o desenvolvimento de apenas calos embriogênicos de *Zea mays* em meio contendo sorbitol mostrou a importância do mesmo para o desenvolvimento embrionário (SWEDLUND; LOCY, 1993).

Já no meio com sacarose, os carboidratos estão disponíveis para serem metabolizados, provavelmente sendo consumidos nas primeiras semanas de maturação. Sabe-se que a sacarose, quando autoclavada, é parcialmente hidrolisada em glicose e frutose, principalmente quando está dissolvida nos sais do meio de cultura, alterando o potencial osmótico do meio (DE PAIVA NETO; OTONI, 2003). Além disso, a glicose, quando autoclavada, pode ser oxidada em ácidos de açúcar durante a autoclavagem, diminuindo sua disponibilidade (HISAJIMA; THORPE, 1985).

A presença de glicose e frutose após 45 dias de maturação no meio com sorbitol mostra que ainda há disponibilidade de carboidratos para o desenvolvimento dos embriões já em fase de conversão. Além disso, o sorbitol pode alterar o potencial hídrico do meio de cultura, causando estresse osmótico que pode ativar rotas metabólicas relacionadas ao estresse, gerando acúmulo de aminoácidos e açúcares durante a maturação dos embriões somáticos. Outro composto foi o ácido-pirrolino-3-hidroxi-5- carboxílico, que é precursor da prolina, aminoácido relacionado à tolerância das plantas ao estresse. A prolina acumula-se nas células durante o estresse osmótico (HARE; CRESS, 1997, VERBRUGGEN; HERMANS, 2008) e a presença de seu precursor pode mostrar que o sorbitol causou estresse nos embriões somáticos.

No material cultivado em meio contendo PEG, aos 7 dias de maturação, os aminoácidos isoleucina e valina foram representativos, sendo que a isoleucina também aparece no tratamento com sacarose. Isoleucina, leucina e valina são aminoácidos de cadeia ramificada que estão relacionados a respostas a estresses (MATSUI, 2008; BINDER, 2010). Em suas rotas de biossíntese, encontra-se a família de aminotransferases BCAT (*branched chain amino acid transaminase*), sendo que o gene que transcreve a BCAT2, uma aminotransferase encontrada nos plastídeos das células vegetais, tem a transcrição aumentada quando a planta está submetida a algum estresse ou

em resposta ao tratamento com ABA (BINDER, 2010). Outro aminoácido observado em ambos os tratamentos aos 45 dias foi a serina, que é uma das precursoras da glicina betaína, um osmoprotetor celular, essencial para a embriogênese e o desenvolvimento radicular pós-embriônico (ROS *et al.*, 2014). A presença desses compostos mostra o efeito do PEG na indução de estresse osmótico durante a maturação dos embriões somáticos de pupunha, o que pode estar relacionado ao bom enraizamento dos embriões observados quando o PEG estava presente no meio de cultura (CAPÍTULO 1).

Além desses compostos, o ácido benzóico também aparece nos tratamentos com sacarose e PEG. Esse ácido carboxílico é precursor do ácido salicílico e de uma citocinina aromática, a meta-topolina (WIDHALM; DUDAREVA, 2015). O ácido salicílico é um regulador vegetal relacionado à fotossíntese e ao acúmulo de açúcares e políois osmoprotetores e também é sintetizado em resposta a radiação UV-B. A meta-topolina promove a formação de raízes e da parte aérea (GENTILE *et al.*, 2017).

A glicina foi um metabólito presente no tratamento com sacarose aos 45 dias de maturação. Ela pode ser formada a partir da serina e ambas participam em vias de síntese de proteínas e também de metabólitos secundários e à fotorrespiração de plantas C3 (HANSON; ROJE, 2001; JABRIN *et al.*, 2003).

Outros compostos relacionados ao tratamento com PEG foram a valina e o inositol. O inositol é encontrado naturalmente nos eucariotos, e especificamente em plantas ocorrem pelo menos 7 isômeros, sendo o mais abundante o mio-inositol (SENGUPTA *et al.*, 2012). Ainda não se sabe ao certo a função de cada isômero no metabolismo vegetal, mas o mio-inositol desempenha diversas funções nas células, dentre elas a síntese de açúcares que regulam estresse osmótico, germinação de sementes e metabolismo de carboidratos e componentes das membranas celulares (XIONG *et al.*, 2001; MULLER-ROEBER; PICAL, 2002).

Os compostos presentes nos embriões somáticos cultivados no tratamento com manitol foram o próprio manitol, o ácido láctico, a etanolamina e o ácido octadecanóico. A presença do manitol mostrou que ocorreu a absorção do composto, mas ele não foi metabolizado pelos embriões. O tratamento com manitol inibiu o desenvolvimento dos embriões, que acabaram necrosando



após 45 dias. A produção de ácido láctico é uma tentativa de manter a síntese glicolítica de ATP pelas células, já que gera  $\text{NAD}^+$  (SOUZA *et al.*, 2008).

A etanolamina é sintetizada a partir da serina (RONTEIN *et al.*, 2001) e é importante para síntese de fosfolipídeos presentes nas membranas celulares (KWON *et al.*, 2012). Sua presença aos sete dias de maturação pode indicar que houve desestabilização das membranas celulares dos embriões, levando ao não desenvolvimento dos mesmos, devido à incapacidade da espécie em metabolizar o manitol. O mesmo pode ser corroborado pela presença do ácido octadecanóico, envolvido na rota de sinalização ativada por lesões nos tecidos vegetais e precursor do ácido jasmônico, também relacionado às respostas de plantas a lesões e ataques de patógenos (FARMER; RYAN, 1992; BLECHERT *et al.*, 1995).

## 6 CONCLUSÕES

A análise dos metabólitos mostrou que o sorbitol é metabolizado pelas plantas de pupunha mais lentamente que a sacarose e permite uma maior disponibilidade de carboidratos ao longo da maturação. O polietilenoglicol ativou respostas dos embriões ao estresse, como síntese de aminoácidos e inositóis, relacionados ao estresse osmótico e ao metabolismo de carboidratos, assim como o tratamento com sacarose também provocou a síntese de metabólitos relacionados ao estresse osmótico.

Os embriões cultivados no meio com manitol não se desenvolveram devido a não metabolização do manitol, que se acumulou dentro das células vegetais, causando alteração da osmolaridade das células e provavelmente injúrias que geraram o acúmulo de etanolamina e ácido octadecanóico.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUAYO, M. F.; AMPUERO, D.; MANDUJANO, P.; PARADA, R.; MUÑOZ, R.; GALLART, M.; ALTABELLA, T.; CABRERA, R.; STANGE, C.; HANDFORD, M. Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 205, p. 63-75, 2013.

ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V. S. Synthetic seed: prospects and limitations. **Current Science**, v. 78, p. 1438-1444, 2000.

ATTREE, S. M.; POMEROY, M. K.; FOWKE, L. C. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of White spruce for improved triacylglyceral biosynthesis and desiccation tolerance. **Planta**, v. 187, p. 395-404, 1992.

BINDER, S. Branched-chain amino acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **The Arabidopsis Book**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2010.

BLECHERT, S.; BRODSCHELM, W.; HOLDER, S.; et al. The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 10, p. 4099–4105, 1995.

BUNDY, J G.; DAVEY, M. P. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives, **Metabolomics**, v. 3, p. 3-21, 2009.

BUSINGE, E.; BRACKMANN, K.; MORITZ, T.; EGERTSDOTTER, U. Metabolite profiling reveals clear metabolic changes during somatic embryo development of Norway spruce (*Picea abies*). **Tree Physiology**, v. 32, n. 2, p. 232–244, 2012.

BUSINGE, E.; BYGDELL, J.; WINGSLE, G.; MORITZ, T.; EGERTSDOTTER, U. The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation

and germination of Norway spruce somatic embryos. **Physiologia Plantarum**, v. 149, p. 273-285, 2013.

CHANPRAME, S.; KUO, T. M.; WIDHOLM, J. M. Soluble carbohydrate content of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): Somatic and zygotic embryos during development. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, n. 34, p. 64-68, 1998.

DE PAIVA NETO, V. B.; OTONI, W. C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: Does it matter? **Scientia Horticulturae**, v. 97, n. 3–4, p. 193–202, 2003.

FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. **The Plant Cell**, v. 4, n. 2, p. 129–134, 1992.

FIEHN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHEWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, pp.1157-1161, 2000.

FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, pp.155-171, 2002.

GENTILE, A.; FRATTARELLI, A.; NOTA, P.; CONDELLO, E.; CABONI, E. The aromatic cytokinin meta-topolin promotes in vitro propagation, shoot quality and micrografting in *Corylus colurna* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 3, p. 693–703, 2017.

GORBATENKO, O.; HAKMAN, I. Desiccation-tolerant somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) can be produced in liquid cultures and regenerated into plantlets. **International Journal of Plant Science**, v. 162, p. 1211-1218, 2001.

HANSON, A. D.; ROJE, S. One Carbon Metabolism in Higher Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 1, p. 119–137, 2001.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, n. 2, p. 79-102, 1997.

HERINGER, A. S.; STEINMACHER, D. A.; FRAGA, H. P. F.; et al. Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) using RITA® temporary immersion system. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 284–292, 2014.

HISAJIMA, S.; THORPE, T. Carbohydrate utilization and activities of various glycosidases in cultured Japanese morning glory callus. **Plant Tissue Culture Letters**, v. 2, n.1, p. 14-21, 1985.

JABRIN, S.; RAVANEL, S.; GAMBONNET, B.; DOUCE, R.; RÉBEILLÉ, F. One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. **Plant Physiology**, v. 131, p. 1431–1439, 2003.

JAIN, S. M.; AL-KHAYRI, J. M.; JOHNSON, D. V. **Date palm biotechnology**. Springer Dordrech, 730 p., 2011.

JIA, Y.; WONG, D. C. J.; SWEETMAN, C.; BRUNING, J. B.; FORD, C. M. New insights into the evolutionary history of plant sorbitol dehydrogenase. **MC Plant Biology**, v. 15, p.101-124, 2015.

KWON, Y.; YU, S. IN; LEE, H.; et al. Arabidopsis serine decarboxylase mutants implicate the roles of ethanolamine in plant growth and development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3176–3188, 2012.

MATSUI, A.; ISHIDA, J.; MOROSAWA, T.; et al. Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. **Plant Cell Physiology**, v. 49, n. 8, p. 1135–1149, 2008.

MUELLER-ROEBER, B., PICAL, C. Inositol Phospholipid Metabolism in *Arabidopsis*. Characterized and Putative Isoforms of Inositol Phospholipid Kinase and Phosphoinositide-Specific Phospholipase C. **Plant Physiology**, v. 130, n. 1, p. 22–46, 2002.

RONTEIN, D.; NISHIDA, I.; TASHIRO, G.; et al. Plants Synthesize Ethanolamine by Direct Decarboxylation of Serine Using a Pyridoxal Phosphate Enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 38, p. 35523–35529, 2001.

ROS, R.; MUÑOZ-BERTOMEU, J.; KRUEGER, S. Serine in plants: Biosynthesis, metabolism, and functions. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 9, p. 564–569, 2014.

SCHAUER, N.; FERNIE, R. A. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. **Trends in Plant Science**, v.11, n.10, pp. 508-516, 2006.

SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; et al. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS Letters**, v. 579, n. 6, p. 1332–1337, 2005.

SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, S.; GOSWAMI, L.; et al. Manipulation of inositol metabolism for improved plant survival under stress: a “network engineering approach”. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. S15–S23, 2012.

SOUZA, S. M. de; PANIAGO, M. G.; ARRUDA, P.; YUNES, J. A. Sugar levels modulate *sorbitol dehydrogenase* expression in mayze. **Plant Molecular Biology**, v. 68, p. 203-213, 2008.

STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 15–35, 2003.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: Largescale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 817–836, 2003.

SWEDLUND, B.; LOCY, R. D. Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. **Plant Physiology**, v. 103, p. 13391346, 1993.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Ed. 6, Sinauer Associates, Massachusetts, 2017.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, p. 753-759, 2008.

VIANA, A. M.; MANTELL, H. **Somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* – an endangered tree of the Mata Atlântica (S. Brasil)**. In: Jain, S., Gupta, P., Newton, R. (Eds.) Somatic embryogenesis in woody plants. Kluwer Publishers, Dordrecht, pp. 3–30, 1999.

VILLAS-BOAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano IX. n. 36, pp. 58-69, 2006.

WIDHALM, J. R.; DUDAREVA, N. A familiar ring to it: biosynthesis of plant benzoic acids. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 83–97, 2015

XIONG, L.; LEE, B.; ISHITANI, M.; LEE, H.; ZHANG, C.; ZHU, J-K. FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. **Gene & Development**, v. 15, p 1971-1984, 2001.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plant. **Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1411–1423, 1993.

## **CÁPITULO 3**

### **CULTIVO DE PUPUNHEIRA (*Bactris gasipaes* Kunth) EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA**



## RESUMO

Os sistemas de cultura em imersão temporária são uma estratégia eficiente na automação e redução de custos na propagação *in vitro* de espécies vegetais. O sistema de imersão temporária tem inúmeras vantagens sobre o cultivo convencional e já foi desenvolvido para pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth). Entretanto, a produção pode ser melhorada através de modificações do meio de cultura utilizado. O objetivo desse trabalho foi testar diferentes meios de cultura em sistema de imersão temporária e analisar o desenvolvimento das plantas assim como seu conteúdo mineral. Para tal, plântulas derivadas de embriogênese somática foram cultivadas por 12 semanas em um sistema de frascos gêmeos, contendo sais dos meios de cultura MS, Y3 ou N6, vitaminas de Morel e Wetmore e 3% de sacarose, sendo o meio renovado a cada 4 semanas. Após 12 semanas de cultivo foram avaliados o crescimento e o teor mineral das plantas. Os resultados mostraram que os sais do Y3 e do MS foram os mais apropriados para o crescimento vegetal. O comprimento e número de raízes foram superiores em ambos os meios, o que é importante para a sobrevivência após a aclimatização. A análise mineral das plantas mostrou que o potássio e o sódio são elementos importantes para a pupunheira e que o nitrogênio não é necessário em altas concentrações como presente na formulação do meio MS. O meio N6 não produziu mudas de qualidade devido à baixa concentração ou ausência de alguns micronutrientes.

**PALAVRAS-CHAVE:** análise mineral, embriogênese somática, meios de cultura.

## ABSTRACT

The use of temporary immersion culture systems is an efficient strategy to allow automation and reduce the cost of in vitro plant propagation. Temporary immersion system has many advantages on conventional culture and has already been developed for peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth). However, the production can be further improved by alterations in the salt formulation of culture media. The aim of this study was to evaluate the growth of plantlets in different culture media used in the temporary immersion system. Somatic embryoderived young plants were cultivated for 12 weeks in a twin flask system containing MS, Y3 or N6 salts, Morel and Wetmore vitamins and 3% sucrose, with monthly medium refresh. Growth was measured and mineral analyses of the plants were carried out after 12 weeks of culture. Results showed that Y3 and MS salts were the most appropriate for the plant growth. The root number and length were higher in both media than in N6 medium, which is important for post acclimatization survival. The mineral analysis showed that potassium and sodium are important elements for peach palm, and that nitrogen is not required at such a high concentration as in MS formulation. The N6 medium did not generate high quality plants possibly due to the absence or low content of some micronutrients.

**KEY WORDS:** somatic embryogenesis, mineral analysis, culture medium

## 1. INTRODUÇÃO

A micropropagação é uma técnica de grande impacto na produção de várias espécies vegetais, permitindo uma propagação clonal de plantas saudáveis e de boa qualidade (ALBARRÁN *et al.*, 2005). A utilização da micropropagação em âmbito comercial já é realizada em diversos países do mundo com destaque para Europa Ocidental, América do Norte, Ásia, Austrália e Israel. A principal limitação para o acesso dos produtores às mudas micropropagadas é o elevado custo deste tipo de material propagativo, geralmente restrito a produtos de alto valor comercial (ULISSES *et al.*, 2010; RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU, 2015).

Para reduzir custos e otimizar o processo de micropropagação, o uso do meio de cultura líquido, sem adição de agentes geleificantes, aparece como uma solução valiosa (SREEDHAR *et al.*, 2009). Dentre os diferentes tipos de cultivo em meio líquido, destacam-se os sistemas de imersão temporária nos quais o explante fica em contato intermitente com o meio de cultura, o que frequentemente melhora a taxa de multiplicação e a qualidade das mudas produzidas em comparação ao meio semi-sólido (BERTHOULY; ETIENNE 2005, ARAGÓN *et al.* 2010).

O sistema de imersão temporária permite uma renovação da atmosfera do frasco, melhorando a oxigenação e removendo compostos voláteis indesejáveis, como o etileno (ETIENNE; BERTHOULY, 2002; GUPTA; TIMMIS, 2005). O sistema de imersão temporária foi desenvolvido por Steinmacher *et al.* (2011) para a maturação de embriões somáticos de pupunheira e produziu plantas de tamanho maior quando comparadas com as culturas em meio sólido. Além disso, Heringer *et al.* (2014) testaram diferentes sistemas de imersão na multiplicação de grupos de embriões somáticos de pupunha, mostrando que o sistema de imersão tipo RITA® apresentou altas taxas de multiplicação comparado aos outros sistemas testados. Os dois trabalhos utilizaram o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), o mais amplamente utilizado na cultura de tecidos vegetais.

A composição de um meio de cultura é muito importante para o sucesso da micropropagação (RUZIC *et al.*, 2004). Ele contém macronutrientes e

micronutrientes, compostos orgânicos (sacarose, vitaminas, aminoácidos) e geralmente fitoreguladores (GISLEROD *et al.*, 2005). A produtividade *in vitro* está diretamente relacionada ao manuseio adequado das concentrações desses componentes no meio de cultura (SMETANSKA, 2008) e a deficiência em alguns elementos pode causar alterações fisiológicas e morfológicas nas plantas (REED *et al.*, 2013). Além disso, o requerimento nutricional varia de acordo com a espécie e a etapa de desenvolvimento do material vegetal *in vitro* (MEHROTRA *et al.*, 2007).

Diferentes composições de meios de cultura podem desencadear a promoção ou inibição do crescimento vegetal, o desenvolvimento de folhas e raízes e alterar taxas de multiplicação *in vitro*. A análise mineral das plântulas de pupunha cultivadas no sistema de imersão temporária em diferentes meios de cultura pode fornecer informações para uma otimização do meio de cultura padrão e melhorar a qualidade das mudas geradas.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes meios de cultura sobre o crescimento e medir o teor mineral de plântulas de *Bactris gasipaes* obtidas a partir de embriões somáticos em um sistema de imersão temporária.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 INDUÇÃO, MATURAÇÃO E CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS**

Embriões zigóticos excisados de sementes de plantas sem espinhos, provenientes de Rondônia foram utilizados para indução da embriogênese somática. As sementes de pupunha foram descascadas e lavadas para a obtenção dos embriões zigóticos. Em condições assépticas, o material foi desinfestado com álcool 70% por 5 minutos e com uma solução de hipoclorito de sódio 10% mais Tween 20® (0,1% v/v) por 20 minutos seguido de 3 lavagens com água deionizada esterilizada. Em seguida, os embriões foram retirados

com ajuda de pinça e bisturi, sendo imediatamente inoculados em placas de Petri contendo aproximadamente 30 ml de meio de cultura de indução. O meio consistiu dos sais do MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), vitaminas de Morel e Wetmore (MOREL; WETMORE, 1951), 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de glutamina, 10 µM de Picloram, 1 µM de AgNO<sub>3</sub> e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Gelzan (Sigma-Aldrich). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. As placas de Petri foram mantidas em sala de crescimento no escuro até o aparecimento de massas embriogênicas e embriões somáticos globulares.

Os embriões somáticos globulares obtidos foram repicados para um meio de manutenção e multiplicação, o mesmo da indução, acrescido de 1 g.L<sup>-1</sup> de glutamina e o material foi repicado para meio fresco a cada 45 dias. Para maturação e conversão, os embriões somáticos foram transferidos para o MS com vitaminas de Morel, sem os reguladores vegetais e adicionado de 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar no lugar do Gelzan. O meio foi renovado a cada 30 dias até o aparecimento de plântulas completas, que foram utilizadas no experimento de imersão temporária.

### 3.2 CULTIVO NO SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

Plântulas completas com aproximadamente 1 cm de altura foram selecionadas para os experimentos no sistema de imersão temporária (FIGURA 1A), baseado em Steinmacher *et al.* (2011). Resumidamente, o sistema de imersão temporária consistiu de garrafas gêmeas, contendo 20 plantas em uma garrafa plástica PET com capacidade de 5 L e 300 mL de meio de cultura em outra garrafa plástica de mesmo volume (FIGURA 1 A). A imersão ocorreu a cada 6 horas, o meio foi bombeado dentro da garrafa contendo as plantas, que ficaram imersas por 3 minutos, retornando para a outra garrafa. O ar foi filtrado através de um filtro autoclavável com poros de 0,2 µm. Foram testados três meios de cultura com diferentes composições (TABELA 1): sais do MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), sais do Y3 (EEUWEENS, 1976) e do N6 (CHU *et al.*, 1975), com vitaminas de Morel e 3% de sacarose. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, sendo o meio renovado a cada 4 semanas. A cultura foi realizada em sala de

crescimento, com temperatura de  $25\pm3^{\circ}\text{C}$ , sob lâmpadas fluorescentes brancas frias de intensidade luminosa de  $40\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16h.

TABELA 1- COMPOSIÇÃO IÔNICA DOS MEIOS DE CULTURA (MS, Y3 e N6) USADOS NA CULTURA DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* KUNTH EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.

Macronutrientes	Concentração (mM)		
	MS	Y3	N6
$\text{NO}_3^-$	39,41	20	28,00
$\text{NH}_4^+$	20,61	10,00	4,06
$\text{K}^+$	20,04	40	30
$\text{Mg}^+$	1,500	1,002	0,750
$\text{PO}_4^-$	1,25	1,74	2,94
$\text{Ca}^{++}$	2,99	2,99	1,10
$\text{SO}_4^-$	1,73	1,17	0,20
<b>Micronutrientes</b>			
$\text{Na}^+$	0,202	1,81	0,002
Cl	5,90	30,01	2,51
I	0,005	0,050	0,005
B	0,1002	0,050	0,026
Mn	0,132	0,132	0,012
$\text{Zn}^+$	0,03	0,03	0,005
$\text{MoO}_4^-$	0,001	0,001	0
$\text{Cu}^+$	0,001	0,0006	0
Co	0,001	0,001	0
$\text{Fe}^+$	0,1	0,1	0,01
$\text{NH}_4/\text{NO}_3$	0,52	0,50	0,14
Total N	60	40	32

MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), Y3 (EEUWEENS, 1976), N6 (CHU *et al.*, 1975)

### 3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MINERAL

Após 12 semanas, as plantas foram removidas das garrafas para as avaliações e análise mineral (FIGURA 1B). Foram medidos o número de folhas e raízes, o comprimento das três maiores folhas e raízes e a massa fresca.

Para obter a matéria seca, o material foi colocado em uma estufa de secagem à 45°C durante 48 horas e depois a massa seca foi pesada.

A massa seca das plantas foi pulverizada com auxílio de moedor e 0,3 g foram usadas para a extração em um bloco digestor, com 4 ml de ácido nítrico (65%) e 4 ml de peróxido de hidrogênio (30%), aquecido até 120 °C. Após a digestão, P, K, Mg, Cu, Fe e Zn foram quantificados em um espectrofotômetro de emissão ótica (Varian 720-ES). Para o N, 0,15 g foram pesadas e a quantificação feita em um analisador elementar (Vario EL III).

### 3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento consistiu de três tratamentos com 5 repetições cada, sendo a unidade experimental uma garrafa com 20 plantas cada, totalizando 100 plantas por meio de cultura. Os dados da análise morfológica e da análise mineral foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando o software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2016).

FIGURA 1. A: SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA DE TIPO FRASCOS GÊMEOS. BARRA = 4,4 CM. B: PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* KUNTH CONVERTIDAS A PARTIR DE EMBRIÕES SOMÁTICOS UTILIZADAS COMO EXPLANTES INICIAIS. BARRA = 0,52 CM. C: APÓS 12 SEMANAS DE CULTIVO EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA EM MEIO DE CULTURA MS. BARRA = 3,3 CM. p=PLÂNTULAS; m= MEIO DE CULTURA



#### 4. RESULTADOS

Após 12 semanas de cultura, os resultados mostraram que os meios de cultura Y3 e MS foram melhores que o meio N6 para a maioria dos parâmetros analisados (TABELA 2). As plantas cultivadas nos meios MS e Y3 estavam mais vigorosas e com menor formação de tecido haustorial (FIGURA 2 A; B) do que as plantas cultivadas no meio N6, que estavam mais oxidadas (dados não mostrados), com folhas malformadas e cloróticas (FIGURA 2C).

A massa fresca e seca das plantas foi maior no meio Y3 que no meio N6, devido à baixa formação de raízes e folhas nesse último meio (FIGURA 2C).



TABELA 2. CRESCIMENTO DE PLANTAS DE *Bactris gasipaes* APÓS 12 SEMANAS DECULTIVO EM TRÊS MEIOS DE CULTURA EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

Parâmetros*	MS	Y3	N6	CV(%)
Número de folhas	3,41 a	3,45 a	1,28 b	22,04
Numero de raízes	1,632 ab	2,248 a	1,07 b	30,21
Comprimento médio folhas (cm)	2,86 a	2,98 a	1,51 b	30,94
Comprimento médio raízes (cm)	0,66 a	0,81 a	0,47 a	33,88
Massa fresca (g.planta <sup>-1</sup> )	1,007 ab	1,1488 a	0,5531b	32,44
Massa seca (g.planta <sup>-1</sup> )	0,1326 ab	0,2127 a	0,0844 b	32,58

\* Média por planta.

Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey à 5% de probabilidade.

Considerando a análise mineral, houve diferenças significativas entre os principais teores minerais das plantas cultivadas nos diferentes meios de cultura (TABELA 3). Os teores de N, Mg, Mn, Zn e Ca foram maiores nas plantas cultivadas no meio MS do que nos outros meios. Entretanto, não houve diferença entre o conteúdo de Ca, Mg e Mn para as plantas cultivadas nos meios MS e Y3. O conteúdo de K foi maior no Y3 e no N6 e o conteúdo de P foi superior nas plantas cultivadas no meio N6. Somente o Fe teve o mesmo valor em todos os tratamentos (TABELA 3).

FIGURA 2. PLANTAS DE *Bactris gasipaes* KUNTH CRESCIDAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA POR 90 DIAS. A: SAIS DO MEIO MS. B: SAIS DO MEIO Y3. C: SAIS DO MEIO N6. SETA = HAUSTÓRIO. BARRA= 114 MM

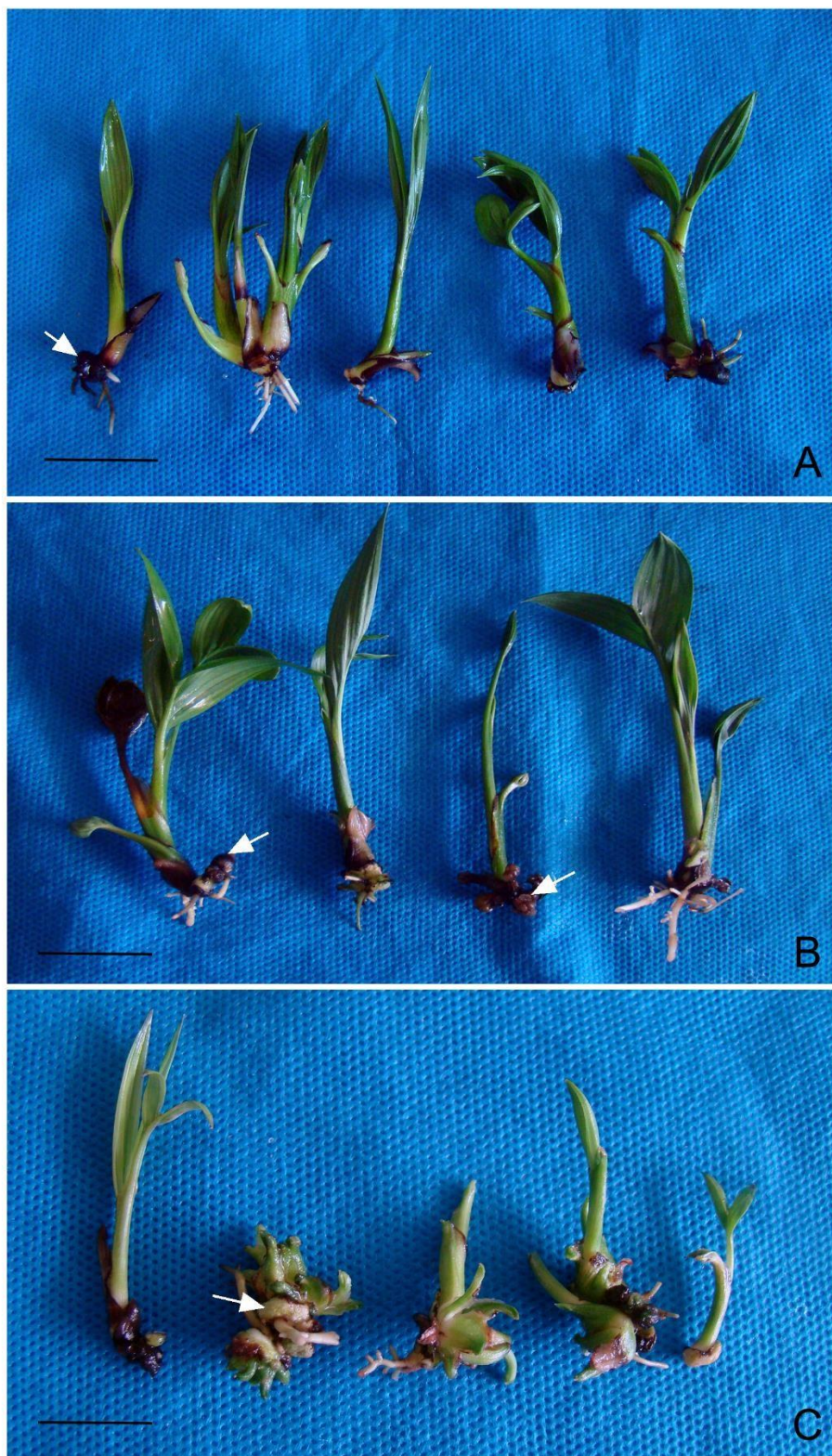


TABELA 3. TEOR DE MACRO E MICRONUTRIENTES EM PLANTAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS POR 12 SEMANAS EM UM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA CONTENDO OS MEIOS MS, Y3 E N6.

Elemento/ Tratamento	MS	Y3	N6	CV (%)
<b>N</b>	66,690 a	56,480 b	41,460 c	15,78
<b>K</b>	41,217 b	59,379 a	57,038 a	15,24
<b>P</b>	4,726 b	5,701 b	7,722 a	5,49
<b>Ca</b>	2,561 a	1,931 ab	1,601 b	11,27
<b>Mg</b>	1,177 a	0,910 ab	0,806 b	29,01
<b>Fe</b>	0,353 a	0,337 a	0,464 a	9,42
<b>Zn</b>	0,107 a	0,079 b	0,059 b	10,18
<b>Mn</b>	0,089 a	0,0645 ab	0,046 b	17,41

Valores em g. Kg<sup>-1</sup>

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados do cultivo de pupunha no sistema de imersão temporária mostraram que o número e comprimento das folhas e o número de raízes apresentaram valores superiores no meio Y3 e no meio MS em comparação com o meio N6. O meio MS é amplamente utilizado no cultivo *in vitro* e tem uma concentração salina alta em comparação à maioria das outras formulações, com um alto nível de nitrogênio e alguns micronutrientes, particularmente boro e manganês (TABELA 1). Entretanto, a formulação mineral do MS não é ideal para todas as espécies vegetais.

Os valores para massa fresca e seca foram maiores nos meios Y3 e MS. Isso foi um resultado interessante, considerando que o meio Y3 tem metade da concentração total de nitrogênio do meio MS. O resultado pode ser devido à presença de uma alta concentração de sódio no meio Y3, que aumenta a absorção de nitrato nas raízes e a sua assimilação nas folhas, como foi mostrado nas plantas de *Amaranthus tricolor* (OHTA *et al.*, 1989). Além disso, a ausência de sódio provocou a redução do tamanho das folhas de mudas de pupunheira crescendo em solução nutritiva (FERNANDES *et al.*, 2001). O sódio é relatado como um elemento importante para espécies de

palmeiras, já que induz um aumento do crescimento e da produtividade (FERNANDES *et al.*, 2002). Essa resposta pode estar relacionada ao efeito do Na em aumentar a concentração de carboidratos solúveis na célula, favorecendo a expansão celular nos tecidos foliares e estimulando a atividade enzimática em raízes (BROADLEY *et al.*, 2012b).

O meio Y3 foi primeiramente desenvolvido para *Cocos nucifera* (EEUWENS, 1976) e oferece bons resultados para outras monocotiledôneas. Esse meio tem alta concentração de potássio, sódio e cloro. O número e comprimento de raízes foi maior no meio Y3 que em outros meios, o que pode estar relacionado a uma alta concentração de potássio no meio. O potássio possui uma função importante na manutenção do turgor celular, síntese proteica e está relacionado a um incremento no crescimento radicular (MEURER, 2006). Em dendezeiro (*E. guineensis* var. *dura*), Muniran *et al.* (2008) também observaram uma taxa de enraizamento mais alta no meio Y3 do que nos meios MS e N6.

A presença de uma maior concentração de cloreto no meio Y3 também pode ter favorecido o maior crescimento das mudas nesse meio, mesmo com menor concentração de nitrogênio que o meio MS. Espécies de palmeiras requerem a presença de altas concentrações de cloro e a falta desse elemento está relacionada à perda de vigor e a senescência prematura. A deficiência de cloro nas plantas pode causar diminuição do crescimento radicular, relacionado à diminuição do alongamento das células radiculares e da absorção de íons pelas raízes (BROADLEY *et al.*, 2012a).

No tratamento com o meio N6, observou-se as menores taxas de crescimento das mudas. Além de possuir menor conteúdo de nitrogênio total, o N6 possui menores concentrações de cálcio, boro, manganês, sódio, cloro e zinco quando comparado com o MS e Y3, além de não possuir os íons cobre, cobalto e molibdênio em sua composição. No trabalho de Matos *et al.* (2013), esses elementos se mostraram importantes para o crescimento de pupunheira em solução nutritiva, sendo que a omissão de cobre e boro foi a que mais influenciou negativamente o crescimento das mudas, que apresentaram diminuição do crescimento foliar e clorose. A deficiência de boro reduz a utilização da energia luminosa absorvida durante a fotossíntese, além de inibir

o crescimento do meristema apical e causar redução da expansão foliar e do alongamento radicular. O cobre é componente de várias enzimas relacionadas ao processo fotossintético e metabolismo do nitrogênio e sua deficiência causa diminuição da taxa fotossintética e da síntese de carboidratos e também problemas na lignificação de paredes células (BROADLEY *et al.*, 2012a).

O manganês e o zinco estavam em baixas concentrações nas plantas de pupunha cultivadas nos meios de cultura Y3 e N6, podendo ser relacionados a problemas no desenvolvimento das mudas. A ausência de manganês e zinco em mudas de pupunheira cultivadas em solução nutritiva provocou redução do crescimento e causou clorose, além da omissão desses microelementos ter sido associada à diminuição da massa seca (MATOS *et al.*, 2013). O manganês está presente em várias enzimas importantes para a síntese proteica, biossíntese de lignina e no processo fotossintético (BROADLEY, *et al.*, 2012b). O zinco também está presente em enzimas de todas as classes, atuando na síntese de DNA, síntese proteica, metabolismo de carboidratos, síntese de auxinas e também para a manutenção das membranas celulares (BROADLEY, *et al.*, 2012b).

Depois do nitrogênio, o potássio e o fósforo foram os nutrientes mais importantes em ordem para pupunha em condições de campo, seguido de cálcio e magnésio (DEENIK *et al.*, 2000). Em relação ao cultivo *in vitro*, observou-se uma maior concentração de fósforo nas plantas cultivadas no meio N6, mas isso não melhorou o crescimento das mesmas. A concentração no meio Y3, intermediária entre as dos meios MS e N6, parece ter sido favorável ao crescimento da pupunha no sistema de imersão temporária. A concentração de fosfato no meio MS é inadequada para várias culturas e seu excesso pode provocar diminuição do crescimento, possivelmente porque precipita o cálcio e alguns micronutrientes ou diminui sua absorção pela planta (GEORGE; DE KLERK, 2008).

## 6. CONCLUSÕES

Os meios MS e Y3 são os melhores para o crescimento da pupunha em sistema de imersão temporária. O sódio, o potássio e o cloro são elementos importantes para a cultura *in vitro* de pupunha e são encontrados em maior concentração no meio de cultura Y3, sendo seu uso recomendado. O meio N6 gerou mudas com tamanho reduzido, com maior oxidação e clorose devido à baixa concentração ou ausência de alguns micronutrientes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBARRÁN, J.; BERTRAND, B.; LARTAUD, M.; ETIENNE, H. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 27-36, 2005.

ARAGÓN, C. E.; ESCALONA, M.; RODRIGUEZ, R.; CAÑAL, M. J.; CAPOTE, I.; PINA, D.; GONZÁLEZ-OLMEDO. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 89–94, 2010.

BERTHOULY, M.; ETIENNE, H. **Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation**. In: HVOSLEF-EIDE, A. K.; PREIL, W. (eds.) Liquid Culture Systems for *in vitro* plant propagation. Springer, Dordrecht, p. 165- 196, 2005.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. **Function of micronutrients**. In: MARSCHNER, P. Mineral Nutrition of Higher Plants, Elsevier, 3ª edição, p.191-248, 2012a.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; MA, J. F.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. **Beneficial Elements**. In: MARSCHNER, P. Mineral Nutrition of Higher Plants, Elsevier, 3ª edição, p.249-269, 2012b.

CHU C.-C., WANG C.-C., SUN C.-S., HSU C., YIN K.-C., CHU C.-Y. & BI F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources. **Science China**, v. 18, 659668, 1975.

DEENIK, J.; ARES, A.; YOST, R.S. Fertilization response and nutrient diagnosis in peach palm (*Bactris gasipaes*): A review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 56, n. 3, p. 195–207, 2000.

EEUWEENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and culture in vitro. **Physiologia Plantarum**, v. 36, n. 23-28, 1976.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion system in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 215-231, 2002.

FERNANDES, A. R.; SÉRGIO, G.; MATOS, B. D. E.; CARVALHO, J. G. D. E. Deficiências nutricionais de macronutrientes em mudas de pupunheira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 35, n. 4, p. 1178-1189, 2001.

FERNANDES, A. R.; CARVALHO, J. G.; CURI, N.; PINTO, J. E. B. P.; GUIMARÃES, P. T. G. 2002. Nutrição mineral de mudas de pupunheira sob diferentes níveis de salinidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1.613-1.619, 2002.

GEORGE, E. F.; de KLERK, G-J. The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; de KLERK, G-J. (eds.) **Plant propagation by tissue culture – volume 1. The background**, p. 85, 2008.

GISLEROD, H. R.; SELLIAH, R.; AYEYEH, K. O.; HVOSLEF-EIDE, A. K. **Macro- and micronutrient nutrition of plants in greenhouses, hydroponic systems, and *in vitro* culture on gelled media**. In: HVOSLEF-EIDE, A. K.; PREIL, W. (eds.) *Liquid Culture Systems for in vitro plant propagation*. Springer, Dordrecht, p. 475- 492, 2005.

GUPTA, P. K.; TIMMIS, R. **Mass propagation of conifer trees in liquid cultures – progress towards commercialization**. In: HVOSLEF-EIDE, A. K.;



PREIL, W. (eds.) Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation, Springer, Netherlands, p. 389-342, 2005.

HERINGER, A. S.; STEINMACHER, D. A.; FRAGA, H. P. F.; et al. Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) using RITA temporary immersion system. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 284–292, 2014.

MATOS, G. S. B.; FERNANDES, A. R.; CARVALHO, J. G. Symptoms of deficiency and growth of peach palm seedlings due to omission of micronutrients. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 56, p. 166-172, 2013.

MEHROTRA, S.; GOEL, M. K.; KUKREJA, A. K.; MISHRA, B. N. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 13, p. 1484-1492, 2007.

MEURER, E. J. **Potássio**. In: FERNANDES, M. S. (Ed.) Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 281-298, 2006.

MOREL, G. M.; WETMORE, R. H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v. 38, n. 138–140, 1951.

MUNIRAN, F.; BHORE, S. J.; SHAH, F.H. Micropropagation of *Elaeis guineensis* Jacq. “Dura”: Comparison of three basal media for efficient regeneration. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, p. 79-82, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 473-497, 1962.

OTHA, D.; YASUOKA, S.; TAKAHASHI, F. Sodium stimulates growth of *Amaranthus tricolor* L. plants through enhanced nitrate assimilation. **Plant Physiology**, v. 89, n.4, p. 1102–1105, 1989.

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G. Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 123, p. 657–666, 2015.

REED, B. M.; WADA, S.; DENOMA, J.; NIEDZ, R. P. Improving in vitro mineral nutrition for diverse pear germplasm. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 49, n. 3, p. 343–355, 2013.

RUZIC, D.; SARIC, M.; CEROVIC, R.; CULAFIC, L. Contents of macronutrients and growth of sweet cherry rootstock *in vitro*. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 463-465, 2004.

SREEDHAR, R. V.; VENKATACHALAM, L.; NEELWARNE, B. Hyperhydricity related morphologic and biochemical changes in vanilla (*Vanilla planifolia*). **Journal of Plant Regulation**, v. 28, p. 46-57, 2009.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SMETANSKA, I. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 111, p. 187-228, 2008.

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1463-1475, 2011.

ULISSES, C.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C.; CÂMARA, T. R.  
Clonagem vegetal. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência  
Agrônômica**, v. 7, p. 86-91, 2010.

## **CAPITULO 4**

**MORFOANATOMIA DE PLANTAS DE *Bactris gasipaes* Kunth  
CULTIVADAS *IN VITRO* E *EX VITRO* E ANÁLISE DE ABSORÇÃO DO  
MEIO DE CULTURA**

## RESUMO

As condições às quais as plantas cultivadas *in vitro* são submetidas causam alterações morfoanatômicas que podem dificultar seu desenvolvimento. O cultivo *in vitro* de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) foi estabelecido através da embriogênese somática, mas alguns melhoramentos ainda são necessários. O objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações morfoanatômicas de pupunheira relacionadas ao cultivo *in vitro* e ao processo de embriogênese somática (ES), comparando com o cultivo *ex vitro* (EX) e analisar a absorção de compostos com o uso de um traçador apoplástico. Folhas expandidas das três condições de cultivo foram preparadas para a análise histológica e microscopia eletrônica. Para os testes com traçador apoplástico, soluções de Lucifer Yellow (LYCH) puro e LYCH + glicose foram aplicadas nas lâminas foliares de plantas cultivadas em meio semi-sólido ou diluídas no meio de cultura líquido em um sistema de imersão temporária. As lâminas foram coletadas, fixadas e analisadas. Houve diferenças significativas entre plantas EX e ES. A espessura das lâminas foliares de plantas obtidas por embriogênese somática foi menor que nas outras, a cutícula era menos espessa e houve baixa deposição de ceras. Elas apresentaram estruturas pouco desenvolvidas, indicando a necessidade de uma etapa de maturação definida para converter plântulas com tecidos bem formados. O traçador apoplástico não penetrou nas lâminas foliares sozinho, só quando foi conjugado à glicose. Foi observada uma rápida absorção do LYCH+glicose pelos tecidos cultivados no meio líquido e semi-sólido, chegando ao simplasto das células, mostrando que ocorre entrada do composto através da membrana plasmática, possivelmente por endocitose.

**Palavras-chave:** Arecaceae, cera epicuticular, cutícula, Lucifer Yellow CH, pupunheira

## ABSTRACT

*In vitro* cultured plants are exposed to conditions that cause morphoanatomical changes that may hinder its development and *ex vitro* establishment. *In vitro* cultures of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) were established by somatic embryogenesis but some improvements in maturation step are still needed. The aim of this study was to improve this step by studying morpho-anatomical differences in peach palm leaves of three kinds of plants: greenhouse cultured plants, *in vitro* plants developed from *in vitro* germinated seeds and somatic embryo-derived plants. Moreover, the absorption of culture medium by the plant tissues was studied through an apoplastic tracer. Expanded leaves were prepared for histological analyses and scanning electron microscopy. For apoplast tracer tests, solutions of pure Lucifer Yellow and Lucifer Yellow+glucose were applied to the leaf blades of plantlets grown in semi-solid medium or diluted in liquid medium in a temporary immersion system. The leaf blades were collected, fixed and analysed. The somatic embryo-derived plants showed structural alterations of the leaves, the cuticle was thinner than in other leaves and epicuticular wax was present but poorly deposited. In *in vitro* cultured plants, the deposition of epicuticular wax on the leaves was irregular while in the greenhouse plants it was regular and abundant. These alterations in somatic embryo-derived leaves could hinder the acclimatization and development of peach palm plants so it is necessary to improve the protocol of somatic embryogenesis to produce better plants. There was no penetration of the apoplastic tracer alone in leaf blades, only when it was conjugated to glucose. A rapid absorption of the tracer by the plant tissues was observed when the plants were cultured in the liquid medium. The tracer linked to glucose reached the cell symplast, showing that it crosses the plasmalemma, possibly by endocytosis.

**Keywords:** cuticle, epicuticular wax, Lucifer Yellow CH.

## 1.INTRODUÇÃO

As condições da cultura *in vitro* são muito diferentes das condições da casa-de-vegetação ou do campo, o que faz com que a adaptação das plantas que crescem *in vitro* para as condições *ex vitro* seja difícil. Essas condições da cultura *in vitro*, como a baixa intensidade luminosa e alta umidade relativa do ar bem como a composição do meio de cultura, podem determinar a formação de plantas com anormalidades morfológicas, anatômicas ou fisiológicas (HAZARIKA, 2006; POSPISILOVÁ, *et al.*, 1999). Alterações estomáticas, cutícula fina, mesofilo foliar pouco diferenciado e alterações na quantidade e estrutura dos cloroplastos podem causar a mortalidade em plantas transferidas para as condições *ex vitro* (BRAINERD; FUCHIGAMI, 1982; DHAWAN e BHOJWANI, 1987; DÍAZ-PÉREZ *et al.*, 1995).

O sucesso da propagação clonal é alcançado quando um grande número de plantas é obtido em larga escala e a um baixo custo, com uma alta taxa de sobrevivência nas condições de campo. Um estudo das características morfoanatômicas juntamente com ajustes nas condições *in vitro* e durante a aclimatização é importante para o sucesso dos protocolos de propagação (ISAH, 2015).

Em relação às espécies de palmeiras, poucos artigos contemplam a morfofisiologia das plantas durante a conversão, mostrando os tecidos que dão origem aos embriões somáticos e a anatomia das diferentes fases de desenvolvimento (BATAGIN-PIOTTO *et al.*, 2012; LUIS, *et al.*, 2010).

A embriogênese somática de pupunha e sua multiplicação *in vitro* usando a embriogênese secundária (*Bactris gasipaes* Kunth) já foram estabelecidas e muitos dos fatores afetando a indução dos embriões somáticos têm sido reconhecidos (STEINMACHER, *et al.*, 2007 a, b, STEINMACHER *et al.*, 2011). Apesar disso, a baixa taxa de enraizamento durante a aclimatização e o desenvolvimento lento em ambiente de casa-de-vegetação ainda reduzem a eficácia do processo. Entretanto, Batagin-Piotto *et al.* (2012), estudando plantas de pupunha cultivadas *in vitro* e aclimatizadas, não observaram diferenças morfoanatômicas que pudessem explicar a dificuldade de enraizamento durante a aclimatização.

Compreender a estrutura anatômica pode ajudar no refinamento dos protocolos e melhorar as taxas de regeneração das plantas. Além disso, a comparação entre plantas obtidas por embriogênese somática e aquelas obtidas através da embriogênese zigótica pode revelar algumas modificações relacionadas ao baixo desenvolvimento das plantas depois do processo de aclimatização.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Observar as diferenças morfoanatômicas em plantas originadas da germinação *in vitro*, germinação *ex vitro* e derivadas da embriogênese somática, assim como analisar a absorção foliar de compostos do meio de cultura para avaliar as possíveis alterações relacionadas à dificuldade de desenvolvimento pós aclimatização.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analisar algumas características morfoanatômicas de lâminas foliares de plantas de pupunha oriundas da germinação *in vitro*, em casa de vegetação e derivadas da embriogênese somática.

Estudar a absorção da glicose por plantas oriundas de embriogênese somática cultivadas em meio semi-sólido e meio líquido usando um traçador apoplástico.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Sementes de pupunha lisa provenientes do projeto RECA, localizado em Rondônia, foram utilizadas para germinação *in vitro* e *ex vitro* e para a indução da embriogênese somática.



### 3.2 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

O endocarpo das sementes foi removido e as sementes foram esterilizadas sob condições assépticas através de uma imersão em álcool 70% por 5 minutos seguido de uma imersão em solução de hipoclorito de sódio 10% mais uma gota de Tween 20 a cada 100 ml de solução (0,1% v/v) durante 30 minutos. Em seguida, o material foi enxaguado três vezes em água destilada autoclavada, sendo os embriões zigóticos removidos assepticamente das amêndoas e cultivados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de germinação. Esse meio continha sais do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) vitaminas de Morel (MOREL; WETMORE, 1951), 3% de sacarose, 0,15% de carvão ativado e 0,7% de ágar (Himedia®). As culturas foram mantidas por três meses a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob iluminação com lâmpadas fluorescentes fornecendo luz branca fria, com uma densidade de fluxo de fótons fotossintéticos de  $20\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16h.

### 3.3 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

O procedimento a seguir foi baseado em Steinmacher *et al.* (2011). Os embriões zigóticos foram cultivados em placas de Petri contendo 30 mL de meio de indução, composto por sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), vitaminas de Morel (MOREL; WETMORE, 1951), 3% de sacarose, 10  $\mu\text{M}$  Picloram, 1  $\mu\text{M}$  de nitrato de prata, e 0,25% de Gelzan (Sigma-Aldrich). As culturas foram mantidas em ambiente no escuro até a formação de massas embriogênicas e embriões somáticos globulares, sendo então transferidas para um meio de conversão, com a mesma composição descrita acima, sem a adição de Picloram e nitrato de prata, suplementado com 0,1% de glutamina e 0,15% de carvão ativado. As plantas obtidas após o período de conversão (cerca de 2 meses) foram então cultivadas em meio de germinação, contendo sais do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) vitaminas de Morel (MOREL; WETMORE, 1951), 3% de sacarose, 0,15% de carvão ativado e 0,7% de ágar (Himedia®), sendo renovado a cada 4 semanas até as plantas atingirem aproximadamente 10 cm de altura.

### 3.4 GERMINAÇÃO *EX VITRO*

As sementes foram colocadas para germinar em sementeiras plásticas contendo areia lavada por 90 dias. Após isso, as plântulas geradas foram transferidas para sacos plásticos de 0,5 litros contendo uma mistura de solo e casca de arroz carbonizada (1:1). Todo material foi mantido em casa de vegetação com uma densidade de fluxos de fótons fotossintéticos de aproximadamente  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e as plantas irrigadas manualmente 5 vezes por semana.

### 3.5 HISTOLOGIA

Foram coletadas lâminas foliares expandidas, com cerca de 6 cm de comprimento, de plantas germinadas *in vitro*, com aproximadamente quatro meses de cultivo, e plantas obtidas por embriogênese somática com quatro meses de cultivo após a conversão. No caso das mudas obtidas da germinação de sementes, a segunda lâmina foliar completamente expandida foi coletada de plantas com cinco meses de idade. Algumas lâminas foram dissociadas em solução de Franklin (1945) e coradas com uma solução de safranina (0,05%), montadas com glicerina e fotografadas. Para as análises histológicas, as amostras foram fixadas em uma solução de FAA (JOHANSEN, 1940), desidratadas em etanol e então infiltradas em historesina (Leica) de acordo com as instruções do fabricante. Secções foram obtidas em micrótomo de rotação e as lâminas coradas com 0,1% de azul de tolúidina (O'BRIEN *et al.*, 1964), montadas em água para então serem observadas e fotografadas em fotomicroscópio Olympus BX 41. Três lâminas foram tratadas com 0,01 % de auramina O (Sigma-Aldrich) diluída em água para identificação de lipídios (CONSIDINE; KNOX, 1979) e imediatamente observadas em microscópio de fluorescência equipado com filtro UV (Leica DM 400B).

Os parâmetros morfológicos foram medidos e quantificados por meio do software ImageJ (RASBAND, 2016). A quantificação da densidade estomática e dos cloroplastos foi determinada em 20 quadrantes de  $1 \text{ mm}^2$  cada. Sete

repetições foram usadas para cada tratamento e cada repetição consistia de seis medições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as medias foram comparadas através do teste de Tukey a 5% de significância, usando o programa Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2016).

### 3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Amostras foram retiradas da região central das lâminas foliares de plantas das três condições de cultivo (n=5). O material foi fixado em FAA (JOHANSEN, 1940), desidratado em série alcoólica, submetido à secagem pelo ponto crítico em aparelho Leica CPD 030, coberto com ouro (Balzers Union FL 9496 SCD 030) e então examinado por meio de microscópio eletrônico de varredura Tescan Vega 3.

### 3.7 ANÁLISE DA ABSORÇÃO DO MEIO DE CULTURA

#### 3.7.1 Material vegetal

Foram utilizadas plântulas convertidas em meio semi-sólido conforme protocolo de embriogênese somática descrito anteriormente, com aproximadamente três meses em meio de conversão e plântulas com aproximadamente três meses de cultivo em sistema de imersão temporária conforme metodologia detalhada no Capítulo 3.

#### 3.7.2 Plantas cultivadas em meio semi-sólido

Os testes para observação da absorção do meio foram efetuados com uso de solução 1% de Lucifer Yellow CH (sal de lítio) (LYCH) (Sigma-Aldrich), filtroesterilizada, e com a mesma solução adicionada de glicose 1 % e esterilizada por filtração. Aplicou-se gotas das soluções separadamente sobre a face adaxial das lâminas foliares completamente expandidas com auxílio de um micropipetador. As plantas tratadas com a solução foram mantidas no

escuro e as regiões da lâmina foliar contendo as gotas coletadas após 2, 4, 8, 12, 18, 24, 72, 120, 168 e 360 horas de exposição ao corante.

As lâminas coletadas foram lavadas com água destilada e fixadas em uma solução de glutaraldeído 1% em tampão fosfato pH 7,0 e mantidas em geladeira, no escuro.

### 3.7.3 Plantas cultivadas no sistema de imersão temporária

Ambas as soluções de LYCH foram adicionadas ao meio líquido, na proporção de 145 mL de meio de cultura MS e 5 mL de solução de LYCH 0,1% ou solução de LYCH + glicose 0,1%. As lâminas foliares foram coletadas após 2, 4, 12, 24, 72 e 120 horas. Após a coleta, as lâminas foliares foram lavadas com água destilada e as amostras fixadas em uma solução de glutaraldeído 1% em tampão fosfato pH 7,0 e mantidas em geladeira, no escuro.

As lâminas foliares fixadas foram lavadas com água destilada e seccionadas à mão livre, montadas em lâminas com a face adaxial voltada para cima em meio de montagem contendo tampão PBS (tampão fosfato salino): glicerol (1:1 v: v). As imagens foram capturadas em microscópio confocal Zeiss LSM 510-Meta (excitação com laser de diodo a 488 nm e emissão entre 510-530 nm) e em microscópio *widefield* Leica DM 5500.

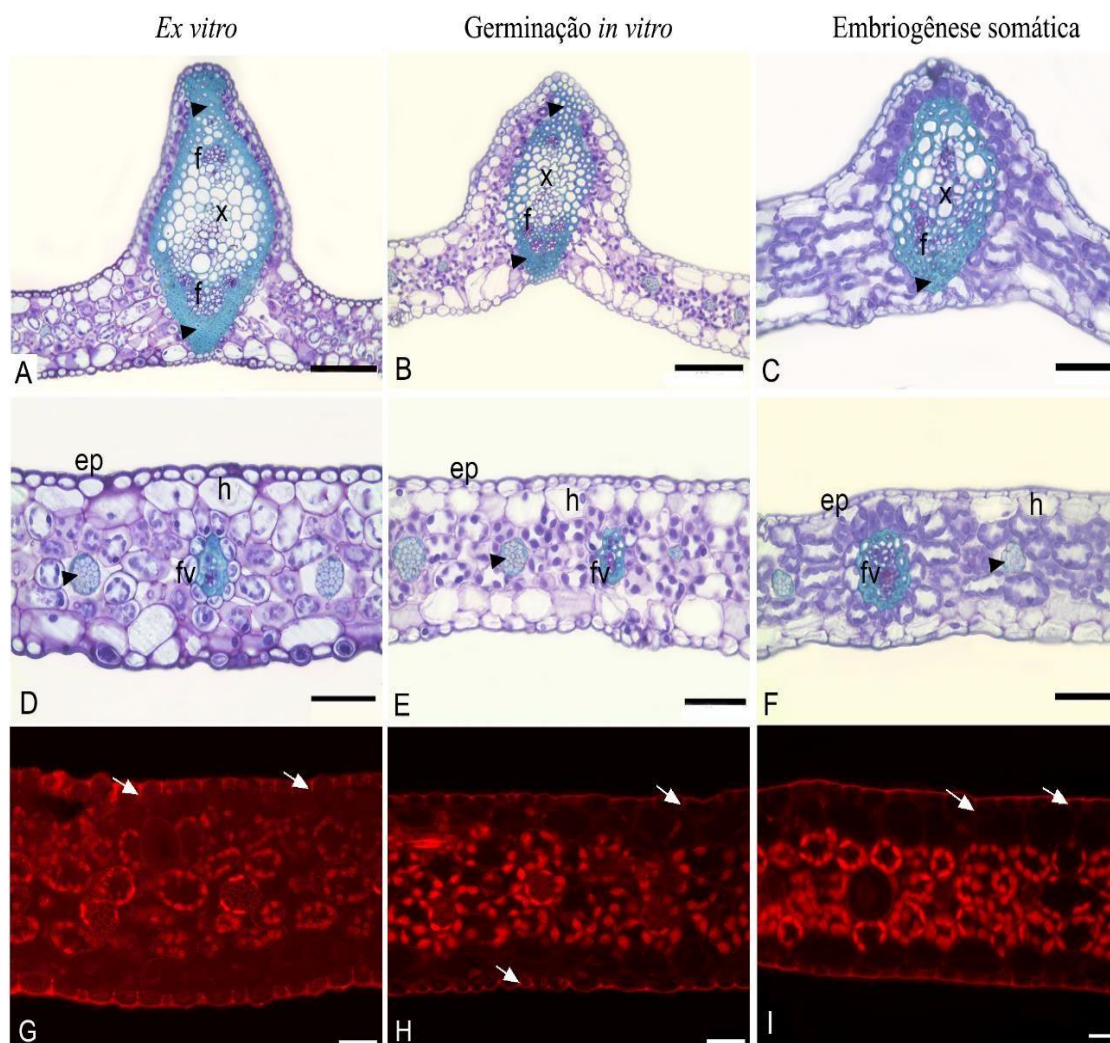
## 4.RESULTADOS

### 4.1 HISTOLOGIA

Algumas das diferenças anatômicas identificadas entre lâminas foliares de plantas germinandas *in vitro*, *ex vitro* e derivadas da embriogênese somática são apresentadas na Figura 1. Nas plantas de germinação *ex vitro*, a epiderme apresentou células arredondadas (FIGURA 1A), cutícula íntegra ao longo da epiderme e sobre o ostíolo estomático (FIGURA 1G). Logo internamente à epiderme, encontrava-se uma hipoderme composta de células maiores que da epiderme, sem cloroplastos (FIGURA 1D). A espessura da epiderme e da hipoderme adaxial mostraram diferenças significativas quando comparadas às

lâminas das plantas derivadas de embriogênese somática (TABELA 1). O mesófilo, composto de clorênquima com células irregularmente arredondadas, apresentou-se mais espesso do que nos outros tratamentos (TABELA 1), além de possuir feixes de fibras não vasculares e pequenos feixes vasculares equidistantes (FIGURA 1D). As nervuras medianas eram adaxialmente proeminentes e apresentavam-se compostas de xilema e floema envolvidos por uma densa bainha de fibras esclerenquimáticas. O feixe vascular colateral apresentou um metaxilema e feixes de floema (FIGURA 1A). A nervura mediana estava abaxialmente proeminente, afilada e simples. Além disso, as lâminas foliares das plantas de germinação *ex vitro* eram significativamente mais espessas que às de plantas derivadas da germinação *in vitro* e da embriogênese somática (TABELA 1).

FIGURA 1. SECÇÕES TRANSVERSAIS DE LÂMINAS FOLIARES DE *Bactris gasipaes* Kunth EM TRÊS CONDIÇÕES DE CULTIVO. **A, D.** FOLHAS DE PLANTAS DE GERMINAÇÃO *EX VITRO*. **C, E** FOLHAS DE PLANTAS GERMINADAS *IN VITRO*, MOSTRANDO UM FEIXE VASCULAR COM XILEMA (x) E FLOEMA (f) COM ALGUMAS ALTERAÇÕES (E). **C, F** FOLHAS DE PLANTAS DERIVADAS DE EMBRIÕES SOMÁTICOS, MOSTRANDO UM FEIXE VASCULAR MAL FORMADO, COM MENOS FIBRAS. **G, H, I** SECÇÕES TRANSVERSAIS CORADAS COM AURAMINA O. NOTE A PRESENÇA DE FLANGES CUTICULARES (SETA) SOBRE AS PAREDES ANTICLINAIS. fv = FEIXE VASCULAR; PONTA DE SETA = FEIXES DE FIBRAS, ep = EPIDERME



A epiderme das plantas cultivadas *in vitro* apresentou células arredondadas (FIGURA 1B), mas, em algumas regiões, essas células apresentavam um formato irregular (FIGURA 1 B, E). A cutícula e a parede celular estavam menos evidentes do que nas lâminas foliares da casa de vegetação (FIGURA 1H, TABELA 1). A hipoderme estava mais uniforme e desenvolvida, com células largas. O mesófilo e o clorênquima estavam mais compactos que nas lâminas foliares da casa de vegetação (FIGURA 1E, TABELA 1) e a nervura mediana era similar às das lâminas foliares de

germinação *ex vitro*, apesar de menos desenvolvidas, com uma bainha de fibras esclerenquimáticas irregular envolvendo completamente o feixe vascular. Os feixes vasculares menores eram menos desenvolvidos que os das lâminas foliares de germinação *ex vitro* (FIGURA 1E). Ocorreu um número menor de cloroplastos por mm<sup>2</sup> em comparação com as lâminas foliares dos outros tratamentos (TABELA 1). Em relação à densidade estomática, não houve diferença entre os tratamentos, tanto para a face adaxial quanto para a face abaxial das lâminas foliares (TABELA 1).

As lâminas foliares das plantas derivadas da embriogênese somática tinham uma epiderme com células irregulares (FIGURA 1C, F). A cutícula e a parede estavam menos evidentes que a das lâminas foliares de germinação *ex vitro* (FIGURA 1I, TABELA 1). A hipoderme estava presente; o mesófilo estava mais compacto que no caso das lâminas de plantas crescidas *in vitro* e mostrava um clorênquima desorganizado com células aparentemente maiores e irregulares e espaços intercelulares mais evidentes que as germinadas *in vitro* (FIGURA 1F). O número de cloroplastos era maior do que nas lâminas de plantas crescidas *in vitro* e similar às das plantas de germinação *ex vitro* (TABELA 1). O feixe vascular mediano tinha menos fibras esclerenquimáticas que o feixe das lâminas de germinação *ex vitro* e de plantas crescidas *in vitro* e uma pequena área continha elementos de vaso indiferenciados.

TABELA 1 QUANTIFICAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LÂMINAS FOLIARES DE PLANTAS DE *Bactris gasipaes* Kunth PROVENIENTES DA GERMINAÇÃO *IN VITRO*, GERMINAÇÃO *EX VITRO* E DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.

Parâmetros	Casa de vegetação	<i>In vitro</i>	mbriogênese somática	CV (%)
Espessura foliar ( $\mu\text{m}$ )	124,34 a	109,08 b	95,81 b	13,25
Cutícula adaxial ( $\mu\text{m}$ )	1,028 a	1,004 ab	0,781 b	12,24
Cutícula abaxial ( $\mu\text{m}$ )	1,068 a	0,966 ab	0,815 b	9,05
Epiderme adaxial ( $\mu\text{m}$ )	11,243 a	10,808 ab	9,513 b	14,12
Epiderme abaxial ( $\mu\text{m}$ )	11,56 a	10,808 ab	9,558 b	15,59
Hipoderme adaxial ( $\mu\text{m}$ )	18,354 a	17,538 a	15,987 a	16,78
Hipoderme abaxial ( $\mu\text{m}$ )	18,822 a	17,963 ab	14,199 b	18,20
Clorênquima ( $\mu\text{m}$ )	69,289 a	57,286 b	52,233 b	17,56
Cloroplastos ( $\text{n}^\circ\text{mm}^{-2}$ )	160,961 a	114,263 b	160,315 a	12,32
Densidade estomática adaxial ( $\text{n}^\circ\text{mm}^{-2}$ )	9,27 a	10,78 a	12,23 a	14,07
Densidade estomática abaxial ( $\text{n}^\circ\text{mm}^{-2}$ )	58,83 a	59,76 a	60,36 a	10,58

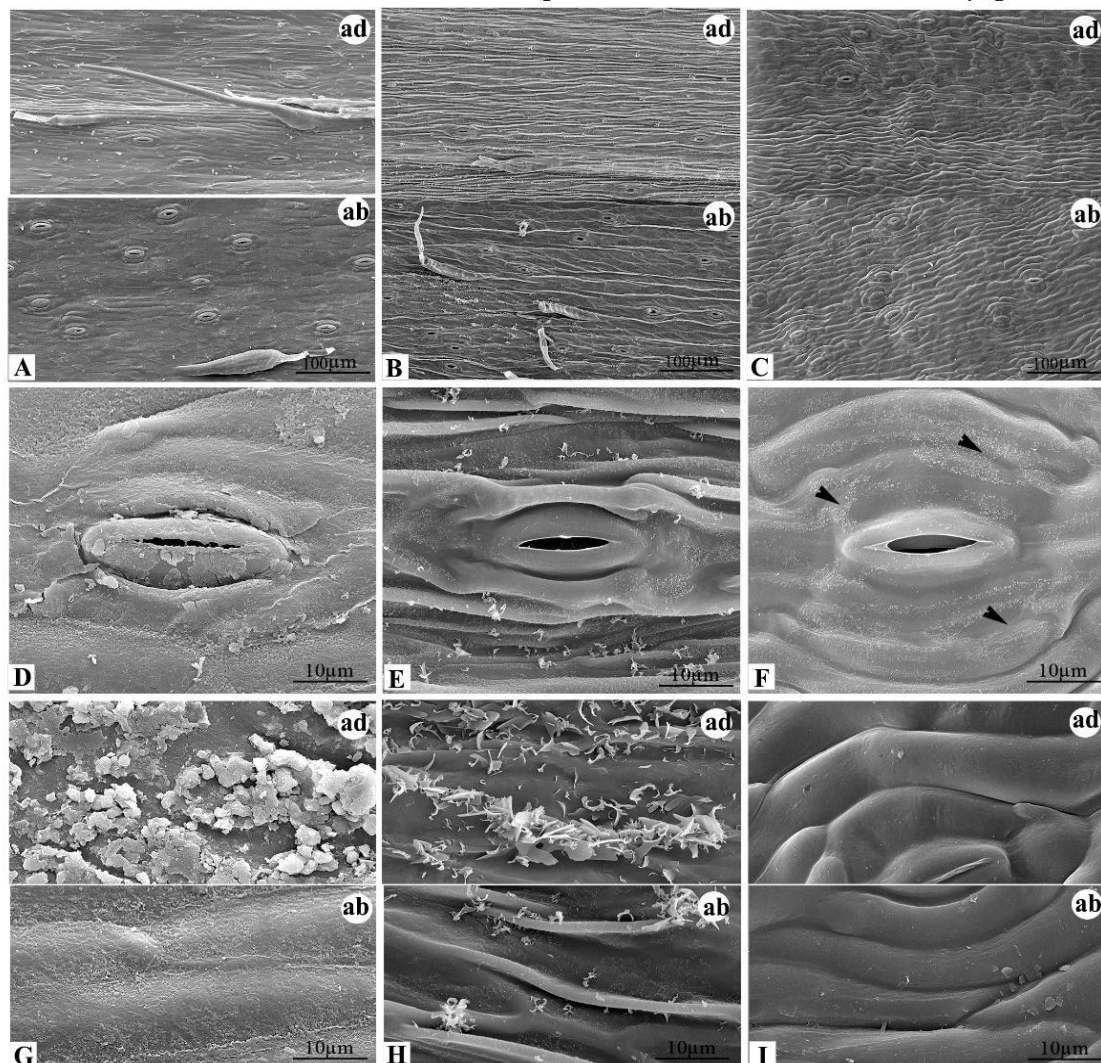
Letras representam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância.

#### 4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

. As plantas de germinação *ex vitro* apresentavam uma deposição de ceras epicuticulares aparentemente maior e com padrão diferente que nos outros tratamentos, tanto na face abaxial quanto na adaxial, (FIGURA 2 A) impossibilitando a observação do contorno das células epidérmicas claramente, principalmente na superfície abaxial (FIGURA 2 G). A deposição foi em crostas (FIGURA 2G) e as vezes se apresentava como uma camada lisa fissurada (FIGURA 2D). A cera epicuticular das plantas cultivadas *in vitro* foi depositada como pequenos grupos irregulares de plaquetas, distribuídas escassamente e irregularmente sobre ambas as faces da lâmina (FIGURA 2 E, H), principalmente sobre a superfície adaxial (FIGURA 2 H). Além disso, apresentou estrias epicuticulares bem evidentes (FIGURA 2 B, E, H). As lâminas foliares das plantas derivadas de embriogênese somática possuíam uma cera epicuticular pouco visível. A superfície epidérmica estava visível em ambas as superfícies adaxial e abaxial (FIGURA 2 C) e uma fina deposição de cera epicuticular pode ser vista escassamente depositada (FIGURA 2 F,I)



FIGURA 2.- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE LÂMINAS FOLIARES DE *Bactris gasipaes* Kunth. SUPERFÍCIE ADAXIAL (ad) E ABAXIAL (ab) DE LÂMINAS FOLIARES PROVENIENTES DE PLANTAS DE GERMINAÇÃO *ex vitro* (A, D, G) CULTIVADAS *IN VITRO* (B, E, H) E DERIVADAS DE EMBRIÕES SOMÁTICOS (C, F, I). F. DEPOSIÇÃO DE CERAS EPICUTICULARES SOBRE OS ESTÔMATOS, VARIÁVEL DE MAIS INTENSA (D) A POUCO APARENTE (PONTA DE SETA EM F) G-I PADRÕES DISTINTOS DE DEPOSIÇÃO DE CERA EPICUTICULAR.



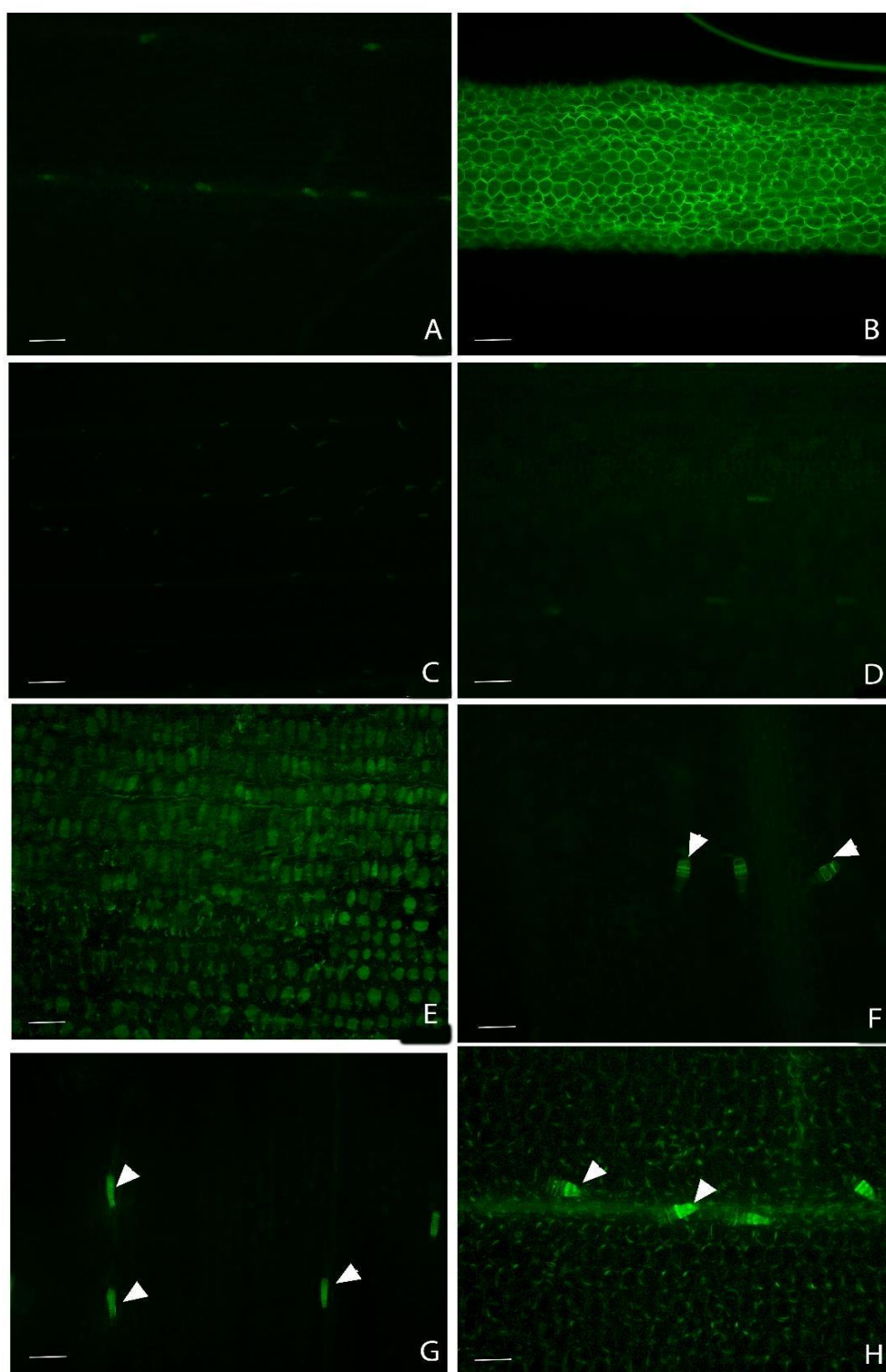
#### 4.3 ANÁLISE DO TRANSPORTE APOPLÁSTICO

Nas lâminas foliares de plantas cultivadas em meio líquido, a solução de Lucifer Yellow 1% penetrou apenas nos tricomas plasmolisados. O controle não tratado mostrou leve fluorescência nos tricomas (FIGURA 3 A). Nas raízes, o traçador penetrou no apoplasto, com intensa fluorescência, após 8 horas no sistema de imersão temporária (FIGURA 3 B).

Não foi observada autofluorescência ou penetração do traçador nas plantas do sistema de imersão temporária após 8 horas (FIGURA 3 C) e 7 dias de exposição (FIGURA 3 D). Quando foi utilizada a solução de Lucifer Yellow 1% com glicose 1%, pôde-se observar a penetração do traçador no apoplasto e simplasto de algumas células epidérmicas, de acordo com o tempo de exposição à solução. No meio líquido, observou-se o traçador no simplasto das células das lâminas foliares após 8 horas de exposição, apresentando intensa fluorescência (FIGURA 3 E).

Em relação às plantas cultivadas em meio semi-sólido, o traçador puro não penetrou no apoplasto e no simplasto das lâminas foliares em nenhuma das amostras (FIGURA 3 F, G). Após 15 dias, houve penetração somente nos tricomas (FIGURA 3, G). Quando foi utilizado o traçador com glicose nas lâminas foliares cultivadas em meio semi-sólido, após oito horas de exposição, o traçador penetrou no apoplasto das células epidérmicas e nos tricomas (FIGURA 3 H).

FIGURA 3 ABSORÇÃO DO TRAÇADOR LUCIFER YELLOW CH EM LÂMINAS FOLIARES (A, C, D, E, F) E RAÍZES (B) DE PLANTAS DE *Bactris gasipaes* KUNTH CULTIVADAS EM MEIO LÍQUIDO (A, B, C, D, E) E SÓLIDO (F, G, H). A. AUTOFLUORESCÊNCIA SEM APLICAÇÃO DO TRAÇADOR. B. PENETRAÇÃO NO APOPLASTO RADICULAR APÓS 8 HORAS DE APLICAÇÃO. C. APÓS 8 HORAS DE APLICAÇÃO. D. APÓS 7 DIAS. E. PENETRAÇÃO NO APOPLASTO DO LYCH+GLICOSE APÓS 8 HORAS. F: PENETRAÇÃO NOS TRICOMAS (PONTA DE SETA) APÓS 7 DIAS. G. PENETRAÇÃO NOS TRICOMAS (PONTA DE SETA) APÓS 15 DIAS.: PENETRAÇÃO DO LYCH + GLICOSE NOS TRICOMAS E NO APOPLASTO APÓS 8 HORAS DE EXPOSIÇÃO. BARRAS = 100  $\mu$ m (A, B, D, F), 50  $\mu$ m (C, G, H), 25  $\mu$ m (E).



## 5. DISCUSSÃO

O status heterotrófico das plantas, a alta umidade relativa do ar e a baixa intensidade luminosa são os principais fatores que induzem alterações nas plantas cultivadas *in vitro*, quando comparadas com as condições *ex vitro* (BARRY-ETIENNE, *et al.*, 2002). Essas condições são responsáveis por modificações estruturais e fisiológicas das plantas. Ademais, diferenças na origem das plantas (zigótica ou somática) podem alterar características anatômicas ou fisiológicas não relacionadas às condições *in vitro*.

Os atributos morfológicos e anatômicos das plantas derivadas de embriogênese somática comparados com os das plantas de germinação zigótica fornecem meios para prever o crescimento e a sobrevivência das plantas após a aclimatização e levar a melhorias no protocolo de cultivo ou na técnica de plantio (LAMHAMED I *et al.*, 2000). No presente trabalho, as folhas das plantas derivadas de embriogênese somática tinham características anatômicas diferentes das plantas cultivadas *in vitro* e nas mesmas condições, sendo as primeiras menos desenvolvidas, apresentando características anatômicas de plantas em início de desenvolvimento. Esse fato pode contribuir para o insucesso da aclimatização e diminuir o interesse de investimentos na propagação de pupunha através da embriogênese somática. Em relação a isso, vários estudos histológicos mostraram que as plantas cultivadas *in vitro* apresentam tecidos menos diferenciados se comparadas com as plantas de casa de vegetação, dificultando a aclimatização e desenvolvimento das mudas (LOURO *et al.*, 2003).

As características anatômicas das folhas são importantes traços funcionais e adaptativos que determinam a capacidade das plantas para sobreviver em diferentes ambientes, principalmente devido às implicações para o potencial fotossintético (SCAFARO *et al.*, 2011; TERASHIMA *et al.*, 2011). No presente trabalho, a estrutura do mesofilo foliar das plantas germinadas *ex vitro* era muito similar a das crescidas *in vitro*, já as derivadas de embriogênese somática apresentavam diferenças estruturais no mesofilo, na epiderme, no número de cloroplastos e na espessura da cutícula. Diferenças nas células do mesofilo como o formato, tamanho e número de

cloroplastos podem resultar em plantas com fisiologia anormal, levando a baixas taxas de sobrevivência durante a aclimatização (EL-BAHR *et al.*, 2003). Semelhantemente, Batagin-Piotto *et al.* (2012) não encontraram diferenças entre a anatomia foliar de plantas de pupunheira derivadas de ápices caulinares cultivadas *in vitro*, durante a aclimatização e plantas germinadas *ex vitro*.

Nosso trabalho revelou alterações estruturais nos feixes vasculares das folhas de plantas derivadas de embriogênese somática, mas os feixes das folhas de plantas germinadas *in vitro* não diferiram das folhas de plantas crescidas *ex vitro*. Da mesma forma, El-Bahr *et al.* (2004) mostraram que as plantas de *Phoenix dactylifera* L. cv 'Zaghlool' obtidas através de embriogênese somática apresentavam tecidos vasculares menos desenvolvidos quando comparados aos de plantas cultivadas *ex vitro*.

A cutícula das plantas derivadas de embriogênese somática estava menos desenvolvida que a das plantas crescidas *in vitro* e *ex vitro*. Essa característica junto com a pouca deposição de cera epicuticular nessas plantas pode ser um dos fatores que provocaram o desenvolvimento lento após a aclimatização. Cutícula e ceras epicuticulares desempenham várias funções fisiológicas, prevenindo a perda de água, permitindo o controle da evapotranspiração através das células-guarda e fornecendo uma barreira essencial para entrada de toxinas e patógenos dentro da planta (LITTLEJOHN *et al.*, 2015). Além disso, a cutícula está envolvida na sinalização do estresse abiótico, regulando a biossíntese de ABA e a resistência ao estresse osmótico e, portanto, permitindo uma melhor sobrevivência das plantas submetidas a alterações ambientais, como aquelas que ocorrem durante a aclimatização (WANG *et al.*, 2011).

O presente trabalho mostrou a presença de ceras epicuticulares sobre as folhas cultivadas *in vitro*. Diferentemente, Batagin-Piotto *et al.* (2012) não encontraram deposição de ceras epicuticulares visíveis sobre as folhas cultivadas *in vitro* e nem sobre as aclimatizadas. Esse resultado pode ser explicado pelas diferentes condições de cultivo (diferenças na composição do meio de cultura utilizado e no tempo de crescimento *in vitro*) e pela origem dos explantes usados nos dois estudos.

A falta de uma etapa definida de maturação no processo de embriogênese somática pode ser a causa do baixo desenvolvimento das plantas de pupunheira. Vários problemas fisiológicos e de desenvolvimento podem surgir durante a propagação clonal *in vitro* (BAIRU; KAINE, 2011). As condições adequadas de conversão e germinação, principalmente a definição das necessidades nutricionais e hormonais dessa espécie, podem melhorar o desenvolvimento das plantas.

Em relação aos experimentos de absorção do traçador apoplástico, pode-se observar que a solução pura de LYCH não penetrou nas células das folhas, tanto no meio sólido quanto no meio líquido. Isso mostra que há uma seleção do que pode passar pela cutícula e penetrar nos tecidos vasculares, de acordo com o tamanho dos poros e fissuras transcuticulares.

Quando se utilizou o LYCH associado à glicose, foi possível observar a penetração do corante no apoplasto das células em ambos os tratamentos. O Lucifer Yellow CH é um traçador apoplástico fluorescente utilizado para analisar a rota de absorção da água através da epiderme de folhas e também para estudo de secreção e reabsorção de nectar em nectários extraflorais (CARDOSO-GUSTAVSON *et al.*, 2013). Além disso, ele foi utilizado para estudar a translocação no floema, devido a sua interação com a sacarose e outros açúcares (OPARKA; PRIOR, 1988; BALACHANDRAN, *et al.*, 1997).

A penetração do corante associado à glicose permite supor que a cutícula possui canais transcuticulares por onde a solução de LYCH ligada à glicose penetrou até o apoplasto. O transporte de Lucifer Yellow está associado à sacarose e outros açúcares, como glicose e frutose e também aminoácidos, como a glutamina e asparagina e já foi demonstrada sua entrada no citoplasma das células vegetais por endocitose, já que o mesmo não atravessa a membrana plasmática (YANO *et al.*, 2004; ETXEBERRIA *et al.*, 2005). O'Driscoll *et al.* (1991) mostraram em *Morinda citrifolia*, que a entrada do corante poderia ocorrer por transportadores de ânions localizados nas membranas das células em suspensão, já que o Lucifer Yellow fica carregado negativamente em soluções aquosas. Entretanto, isso não foi observado quando o traçador puro foi aplicado em pupunheira, provavelmente devido a baixa afinidade com os transportadores de ânions na espécie.

Nas lâminas foliares das plantas cultivadas no meio líquido observou-se a penetração do traçador no simplasto das células com pouco tempo de exposição. Isso mostra que a entrada de glicose e outros carboidratos é mais rápida no sistema de imersão temporária, já que o meio de cultura com o traçador ficava em contato com as plantas por apenas cinco minutos a cada seis horas. Além disso, a absorção de compostos pelas lâminas foliares das plantas e não só pelas raízes é uma das explicações para o maior crescimento das mudas nesse sistema.

## 6 CONCLUSÕES

Foi possível observar diferenças na estrutura das folhas de plantas derivadas de embriogênese somática, que se apresentaram menos desenvolvidas do que a das plantas crescidas *in vitro* e *ex vitro*, mostrando que as fases de maturação e conversão precisam ser otimizadas para produzir plantas com características anatômicas e fisiológicas que facilitem e acelerem sua adaptação à casa de vegetação e às condições de campo. Também se observou a absorção de glicose pela lâmina foliar das plantas, principalmente no sistema de imersão temporária, explicando em parte o maior desenvolvimento das plantas que absorvem os compostos do meio líquido pelas raízes e pelas folhas durante o cultivo *in vitro* nesse sistema.

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAIRU, M. W.; KANE, M.E. Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p. 101–103, 2011.

BALACHANDRAN, S.; XIANG, Y.; SCHOBERT, C.; THOMPSON, G. A.; LUCAS, W. J. Phloem sap proteins from *Curcubita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 94, p. 14150–14155, 1997.

BATAGIN-PIOTTO, K. D.; ALMEIDA, C. V. de; PIOTTO, C. V.; ALMEIDA, M. de. Anatomical analysis of peach palm (*Bactris gasipaes*) leaves cultivated in vitro, ex vitro and in vivo. **Brazilian Journal of Botany**, v. 35, n. 1, p. 71-78, 2012.

BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B.; VASQUEZ, N.; ETIENNE, H. Comparison of somatic embryogenesis-derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated in vitro or ex vitro: Morphological, mineral and water characteristics. **Annals of Botany**, v. 90, p. 77-85, 2002.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L.H. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA, and CO<sub>2</sub>. **Journal of Experimental Botany**, v. 33, p. 388-392, 1982.

CARDOSO-GUSTAVSON, P.; AGUIAR, J. M. R. B. V.; PANSARIN, E. R.; BARROS, F. A light in the shadow: the use of Lucifer Yellow technique to demonstrate nectar reabsorption. **Plant Methods**, v. 9, n. 20, p.1-6, 2013.

CONSIDINE, J.A.; KNOX, R.B. Development and histochemistry of the cells, cell walls, and cuticle of the dermal system of fruit of the grape *Vitis vinifera* L. **Protoplasma**, v. 99, p. 347–365, 1979.



DHAWAN, V.; BHOJWANI, S.S. Hardening *in vitro* and morpho-physiological changes in the leaves during acclimatization of micropagated plants of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Plant Science**, v. 53, p. 65-72, 1987.

DIAZ-PEREZ, J.C.; SUTTER, E.G.; SHACKEL, K.A. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting then in soil. **Physiologia Plantarum**, v. 95, p 225-229, 1995.

EL-BAHR, M.K.; ALI, Z.; SAKER, M. A comparative anatomical study of date palm vitroplants. **Arabian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 219-227, 2004.

EL-BAHR, M.K.; ALI, Z.; TAHA, H.S. *In vitro* propagation of Egyptian date palm cv. Zaghloul: II. Comparative anatomical studies between direct acclimatized and *in vitro* adapted (pre-acclimatized) plantlets. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, p. 701-714, 2003.

ETXEBERRIA, E.; BAROJA-FERNANDEZ, E.; MUÑOZ, F. J.; POZUETAROMERO, J. Sucrose-inducible endocytosis as a mechanism for nutrient uptake in heterotrophic plant cells. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, n. 3, p. 474–481, 2005.

FRANKLIN, G. L. Preparation of thin sections of synthetic resins and woodresins composites and a new macerating method for wood. **Nature**, v. 155, n. 3924, p. 51, 1945.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 105-120, 2006.

ISAH, T. Adjustments to *in vitro* culture conditions and associated anomalies in plants. **Acta Biologica Cracoviensa Botanica**, v. 57, n. 2, p. 9-28, 2015.

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York, Mc Graw-Hill Book Co. Inc., 1940.

LAMHAMEDI, M.S.; CHAMBERLAND, H.; BERNIER, P.Y.; TREMBLAY, F.M. Clonal variation in morphology, growth, physiology, anatomy and ultrastructure of container-grown white spruce somatic plants. **Tree Physiology**, v. 20, p. 869-880, 2000.

LITTLEJOHN, G.R.; MANSFIELD, J.C.; PARKER, D.; LIND, R.; PERFECT, S.; SEYMOUR, M.; SMIRNOFF, N.; LOVE, J.; MOGER, J. *In vivo* chemical and structural analysis of plant cuticular waxes using stimulated Raman scattering microscopy. **Plant Physiology**, v. 168, p. 18-28, 2015.

LOURO, R.P.; SANTIAGO, L.J.M.; dos SANTOS, A.V.; MACHADO, R.D. Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* plants cultivated ex vitro in greenhouse and field conditions. **Trees**, v. 17, n. 1, p. 11-22, 2003.

LUIZ, Z.G.; BEZERRA, K.M.G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n.3, p. 209-215, 2010.

MOREL, G.M., WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v. 38, p. 138–140, 1951.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

O'BRIEN, T.P., FEDER, N., McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

O'DRISCOLL, D.; WILSON, G.; STEER, M. W. Lucifer Yellow and Fluorescein Isothiocyanate uptake by cells of *Morinda citrifolia* in suspension cultures is not

confined to the endocytotic pathway; *Journal of Cell Science*, v. 100, p. 237-241, 1991.

OPARKA, K. J.; PRIOR, D. A. M. Movement of Lucifer Yellow CH in potato tuber storage tissue: A comparison of symplastic and apoplastic transport, **Planta**, v. 176, n 4, p. 533-540, 1988.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 481-497, 1999.

RASBAND, W.S. **Image J**. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 2016.

SCAFARO, A.P.; von CAEMMERER, S.; EVANS, J.R.; ATWELL, B. Temperature response of mesophyll conductance in cultivated and wild *Oryza* species with contrasting mesophyll cell wall thickness. **Plant Cell Environment**, v. 34, p. 1999-2008, 2011.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. The Assitat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 124-132, 2007a.

STEINMACHER, D. A.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, n. 1, p. 15- 22, 2007b.

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1463-1475, 2011.

TERASHIMA, I.; HANBA, Y.T.; THOLEN, D.; NIINEMETS, U. Leaf functional anatomy in relation to photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, p. 108-116, 2011.

WANG, Z.Y.; XIONG, L.; LI, W.; ZHU, J.K.; ZHU, J. The Plant Cuticle Is Required for Osmotic Stress Regulation of Absciscic Acid Biosynthesis and Osmotic Stress Tolerance in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 23, p. 1971-1984, 2011.

YANO, K.; MATSUI, S.; TSUCHIYA, T.; et al. Contribution of the plasma membrane and central vacuole in the formation of autolysosomes in cultured tobacco cells. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 7, p. 951–957, 2004.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados permitiram avaliar a maturação dos embriões somáticos de pupunheira em diferentes meios de cultura, podendo ser utilizados para melhoria do protocolo de embriogênese somática dessa espécie. A análise dos metabólitos relacionados à maturação em diferentes meios de cultura possibilitou uma discussão do efeito dos compostos durante o processo e foi possível identificar alguns metabólitos envolvidos na resposta dos embriões somáticos ao estresse osmótico que esses compostos causam. O sorbitol foi metabolizado pelos embriões somáticos e gerou plântulas individualizadas e com boa formação radicular, assim como no meio de cultura com polietilenoglicol.

Com os estudos em sistema de imersão temporária foi possível avaliar o efeito de alguns elementos minerais no desenvolvimento das mudas de pupunha e abrir caminho para a otimização do meio de cultura, visando a melhoria das mudas produzidas e também uma economia nos insumos utilizados no preparo dos meios. Os estudos anatômicos mostraram que as alterações do ambiente de cultivo influenciaram a morfoanatomia das plantas. Algumas alterações encontradas estavam relacionadas ao processo de embriogênese somática, indicando a necessidade de melhorar o processo, para gerar plântulas com tecidos completamente diferenciados. A análise com o carreador apoplástico mostrou que a glicose é absorvida pelas folhas das plantas cultivadas *in vitro* e que ocorre absorção no simplasto, possivelmente por endocitose, nas folhas de plantas cultivadas no meio líquido.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho apresentou elementos que podem levar a otimização do processo de embriogênese somática em pupunheira através da melhoria do processo de maturação, análises metabólicas, cultivo em sistema de imersão temporária e estudos anatômicos. Os experimentos de maturação mostraram que é possível substituir a sacarose do meio de cultura ou adicionar compostos para que a maturação seja mais eficiente. Recomenda-se a substituição da sacarose pelo sorbitol ou a adição de 100 mg. L de PEG ao meio de cultura com sacarose durante a etapa de maturação dos embriões somáticos. Testar concentrações maiores de PEG no meio pode proporcionar resultados diferentes dos encontrados nesse trabalho. No cultivo em imersão temporária de pupunha, as plântulas se desenvolveram bem no meio de cultura MS e no Y3. Recomenda-se utilizar o meio Y3.

Os estudos morfoanatômicos mostraram que as plântulas obtidas por embriogênese somática tem características anatômicas de plantas pouco desenvolvidas, considerando o tempo de desenvolvimento das mudas. Essas características não foram encontradas nas plântulas obtidas por germinação zigótica *in vitro*, mostrando que o processo de embriogênese precisa ser modificado para melhorar a anatomia das plântulas geradas, com os tecidos completamente diferenciados, principalmente o tecido vascular. Sugere-se mais estudos morfoanatômicos de plântulas geradas com a etapa de maturação definida, utilizando compostos como PEG e sorbitol e também uma análise anatômica das raízes formadas *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAHMANE, L. Date palm micropropagation via organogenesis. In: S. M. Jain, J. M. AlKhayri and D. V. Johnson (Eds.), pp. 69-90. **Date Palm Biotechnology**, Springer, Dordrecht. 2001.
- BEKHEET, S. Direct Organogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) for Propagation of True-to-Type Plants. **Scientia Agriculturae**, vol. 4, n. 3, p. 8592, 2013.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds physiology of development and germination**. New York: Plenum, 367 p., 1994.
- BATAGIN-PIOTTO, K. D.; ALMEIDA, C. V. de; PIOTTO, C. V.; ALMEIDA, M. de. Anatomical analysis of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) leaves cultivated in vitro, ex vitro and in vivo. **Brazilian Journal of Botany**, v. 35, n. 1, p. 71-78, 2012.
- CLEMENT, C. R. Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth). In: JANICK, J.; PAULL, R.E. (eds.) **The encyclopedia of fruit and nuts**. Wallingford, UK, CAB Publishing, p. 93-101, 2008.
- CLEMENT, C.R.; MORA-URPÍ, J. Pejibaye palm (*Bactris gasipaes*, Arecaceae): multi-use potential for the lowland humid tropics. **Economic Botany**, v. 41, n. 2, p. 302-311, 1987.
- DOBROWOLSKA, I., BUSINGE, E., ABREU, I. N.; MORITZ, T., EGERTSDOTTER, U. Metabolome and transcriptome profiling reveal new insights into somatic embryo germination in Norway spruce (*Picea abies*). **Tree Physiology**, v. 37, n. 12, p. 1-15, 2017.

ELHITI, M.; TAHIR, M.; GULDEN, R. H.; KHAMISS, K.; STASOLLA, C; Modulation of embryo-forming capacity in culture through the expression of Brassica genes involved in the regulation of the shoot apical meristem.

**Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 14, p. 4069-4085, 2010.

ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY, E.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n.1, p. 45-54, 2006.

GIBSON, S. I. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. **Plant Physiology**, v. 124, n. 4, p. 1-14, 2000.

GRIBLLE, K.; CONROY, J.P.; HOLFORD, P.; MILHAN, J. P. *In vitro* uptake of minerals by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypts, and relevance to media mineral formulation. **Australian Journal of Botany**, v. 50, p. 713–723, 2002.

KHAN, M. A.; ABBASI, B. H.; ALI, H.; ALI, M.; ADIL, M.; HUSSAIN, I. Temporal variations in metabolite profiles at different growth phases during somatic embryogenesis of *Silybum marianum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, p. 127-139, 2015.

KOMAMINE, A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M.; SUMABORE, S.; TOYA, T.; FUJIWARA A.; TSUKAHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K.; FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 28, n.1, p.11-14, 1991.

IVANOV, A. G.; ANGELOV, M. N. Photosynthesis response to triacontanol correlates with increased dynamics of mesophyll protoplast and chloroplast membranes. **Plant Growth Regulation**, v. 21, n. 2, p. 145–152, 1997.



LIPAVSKÁ, H.; SVOBODOVÁ, H.; ALBRECHTOVÁ, J.; KUMSTÝROVÁ, L.; VÁGNER, M.; VONDRÁKOVÁ, Z. Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 36, p. 260-267, 2000.

MACIEL, S. A.; FERMINO-JUNIOR, P. C. P.; SILVA, R. A. da; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 263-267, 2010.

MODELO V. A.; ANEFALOS, L. C.; TUCCI, M. L. S. Situação atual e perspectivas do cultivo de palmeiras para produção de palmito de alta qualidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, Horticultura Brasileira, n. 30, Salvador, 2012.

NAEEM, M., MASROOR, M.; KHAN, A., MOINUDDIN. Triacantanol: a potent plant growth regulator in agriculture. **Journal of Plant Interactions**, n. 7, n. 2, p. 129-142, 2012.

NEVES, E. J. M.; SANTOS, A. F. dos; RODIGHERI, H. R.; CORRÊA JÚNIOR, C.; BELLETTINI, S.; TESSMANN, D. J. **Cultivo da pupunheira para palmito nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 9p., 2007.

PENTEADO JUNIOR, J. F.; SANTOS, A. F.; NEVES, E. J. M. **Aspectos do agronegócio do palmito de pupunha no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 21p., 2014.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.38, n.2, p. 116-124, 2002.

RUZIC, D.; SARIC, M.; CEROVIC, R.; CULAFIC, L. Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 63, n. 1, p. 9-14, 2000

SANTOS, A. F.; NEVES, E. J. M.; JUNIOR, C. C.; REZENDE, R.; JUNIOR, J. P.; TESSMANN, D. J.; GONÇALVES, A. C. A.; KALIL FILHO, A. N.; RODIGHERI, H. R.; VIDA, J. B.; FREITAS, P. J.; BELLETTINI, S. **Transferência de tecnologia florestal: cultivo de pupunha para produção de palmito**. Colombo: Embrapa Florestas, 24p., 2013.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, v. 43, p. 124-132, 2007a.

STEINMACHER, D. A.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 89, n. 1, p. 15- 22, 2007b.

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, v. 108, p. 1463-1475, 2011.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. *Annals of Botany*, vol. 100, n. 4, p. 1- 11, 2007c.

TANTOS, A.; MÉSZÁROS, A.; FARKAS, T.; SZALAI, J.; HORVÁTH, G. Triacntanol-supported micropropagation of woody plants. *Plant Cell Reports*, v. 20, n. 1, p. 16-21, 2001.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L.  
Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233–249, 2002.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS MATUROS DE *Bactris gasipaes* KUNTH NO TRATAMENTO COM SACAROSE E GLICOSE

One-way analysis of variance

P value < 0.0001

P value summary \*\*\*

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 9

F 10,70

R squared 0,7007

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected) 2,626

P value 0,9174

P value summary ns

Do the variances differ signif. (P < 0.05) No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	33,41	7	4,773
Residual (within columns)	14,27	32	0,4460
<u>Total</u>	<u>47,68</u>	<u>39</u>	

### APÊNDICE 2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS VIÁVEIS DE *Bactris gasipaes* KUNTH NO TRATAMENTO COM SACAROSE E GLICOSE

One-way analysis of variance

P value 0,0003

P value summary \*\*\*

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 8

F 5,519

R squared 0,5470

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected) 23,27

P value 0,0015

P value summary \*\*

Do the variances differ signif. (P < 0.05) Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	26130	7	3733
Residual (within columns)	21640	32	676,4
<u>Total</u>	<u>47780</u>	<u>39</u>	

### APÊNDICE 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA EMBRIOGÊNESE SECUNDÁRIA DE *Bactris gasipaes* KUNTH NO TRATAMENTO COM SACAROSE E GLICOSE

One-way analysis of variance

P value < 0.0001

P value summary \*\*\*

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 8

F 13,11

R squared 0,7414

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)

P value

P value summary ns

Do the variances differ signif. (P < 0.05) No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	36240	7	5177
Residual (within columns)	12640	32	395,0
<u>Total</u>	<u>48880</u>	<u>39</u>	

#### APÊNDICE 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PARTE AÉREA DE *Bactris gasipaes* KUNTH NO TRATAMENTO COM SACAROSE E GLICOSE

##### One-way analysis of variance

P value < 0.0001

P value summary \*\*\*

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 9

F 8,78

R squared 0,661

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)

P value

P value summary ns

Do the variances differ signif. (P < 0.05) No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	10,6	8	1,33
Residual (within columns)	5,45	36	0,151
<u>Total</u>	<u>16,1</u>	<u>44</u>	

#### APÊNDICE 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PARTE RADICULAR DE *Bactris gasipaes* KUNTH NO TRATAMENTO COM SACAROSE E GLICOSE

##### One-way analysis of variance

P value 0,0001

P value summary \*\*\*

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 9

F 5,579

R squared 0,5535

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)

P value

P value summary ns

Do the variances differ signif. (P < 0.05) No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	6,911	8	0,8639
Residual (within columns)	5,575	36	0,1549
<u>Total</u>	<u>12,49</u>	<u>44</u>	

APÊNDICE 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE EMBRIÕES MATUROS DE *Bactris gasipaes* KUNTH NO TRATAMENTO COM PEG E SORBITOL

One-way analysis of variance			
P value	< 0.0001		
P value summary	***		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	8		
F	8,928		
<u>R squared</u>	<u>0,6614</u>		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)	18,88		
P value	0,0086		
P value summary	**		
<u>Do the variances differ signif. (P &lt; 0.05)</u>	<u>Yes</u>		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	3328	7	475,4
Residual (within columns)	1704	32	53,25
Total	5032	39	

APÊNDICE 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE EMBRIÕES MATUROS VIÁVEIS DE *Bactris gasipaes* KUNTH NO TRATAMENTO COM PEG E SORBITOL

One-way analysis of variance			
P value	0,5352		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	8		
F	0,8771		
<u>R squared</u>	<u>0,1610</u>		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)			
P value			
P value summary	ns		
<u>Do the variances differ signif. (P &lt; 0.05)</u>	<u>No</u>		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	3182	7	454,6
Residual (within columns)	16590	32	518,3
Total	19770	39	

APÊNDICE 8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Bactris gasipaes* KUNTH NO TRATAMENTO COM PEG E SORBITOL

One-way analysis of variance			
P value	0,0054		
P value summary	**		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	8		
F	3,636		
R squared	0,4430		
Bartlett's statistic (corrected)	22,03		
P value	0,0025		
P value summary	**		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	26330	7	3761
Residual (within columns)	33100	32	1034
Total	59430	39	

APÊNDICE 9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PARTE AÉREA DE EMBRIÕES CONVERTIDOS DE *Bactris gasipaes* KUNTH NO TRATAMENTO COM PEG E SORBITOL

One-way analysis of variance			
P value	0,0013		
P value summary	**		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	8		
F	4,566		
R squared	0,4997		
Bartlett's statistic (corrected)	17,38		
P value	0,0151		
P value summary	*		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	673,4	7	96,20
Residual (within columns)	674,3	32	21,07

APÊNDICE 10. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PARTE RADICULAR DE EMBRIÕES CONVERTIDOS DE *Bactris gasipaes* KUNTH NO TRATAMENTO COM PEG E SORBITOL

One-way analysis of variance			
P value	0,0101		
P value summary	*		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	8		
F	3,255		
R squared	0,4159		
Bartlett's statistic (corrected)	55,36		
P value	< 0.0001		
P value summary	***		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	21730	7	3105
Residual (within columns)	30520	32	953,7
Total	52250	39	



APÊNDICE 11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE EMBRIÕES MATUROS DE *Bactris gasipaes* KUNTH NO TRATAMENTO COM TRIACONTANOL

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	0.82950	0.27650	0.6386 ns
Resíduo	16	6.92800	0.43300	
Total	19	7.75750		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	16	0.0703	0.6386	0.6011

MG = 1.62500 CV% = 20.49

APÊNDICE 12. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE EMBRIÕES MATUROS VIÁVEIS DE *Bactris gasipaes* KUNTH NO TRATAMENTO COM TRIACONTANOL

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	1901.55169	633.85056	0.7233 ns
Resíduo	16	14021.23044	876.32690	
Total	19	15922.78213		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
3	16	0.7233	0.5527	0.0703

MG = 80.29411 CV% = 16.87

APÊNDICE 13 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA EMBRIOGÊNESE SECUNDÁRIA DE *Bactris gasipaes* KUNTH NO TRATAMENTO COM TRIACONTANOL.

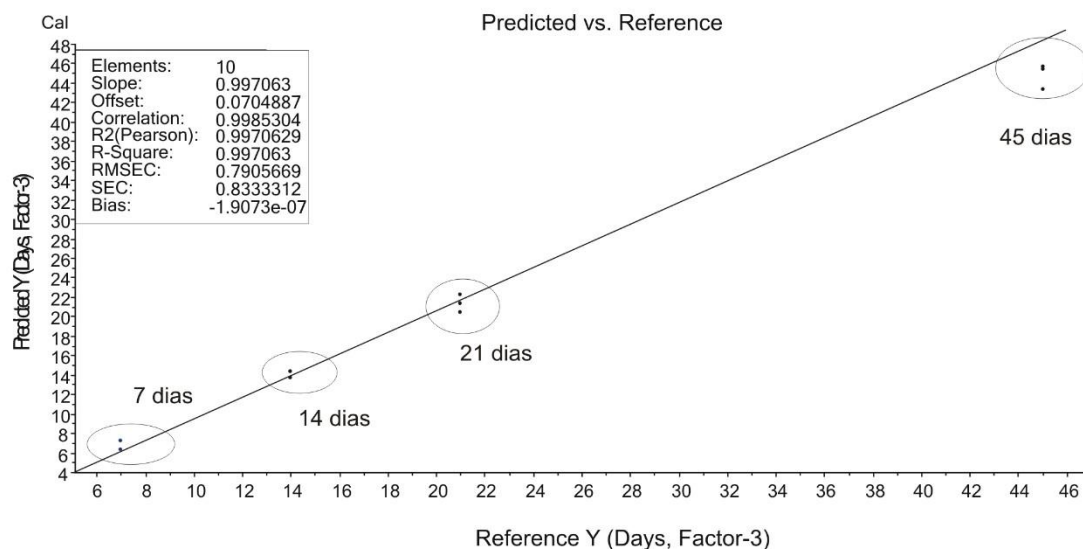
QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	10420.00000	3473.33333	3.8593 *
Resíduo	16	14400.00000	900.00000	
Total	19	24820.00000		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

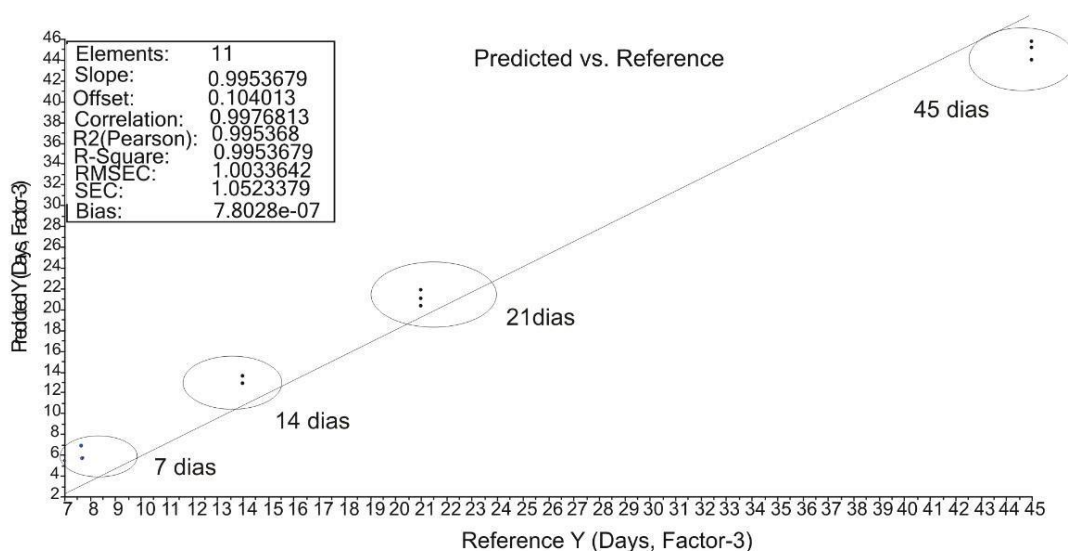
GL	GLR	F-crit	F	p
3	16	3.2389	3.8593	0.0297

MG = 63.00000 CV% = 27.12

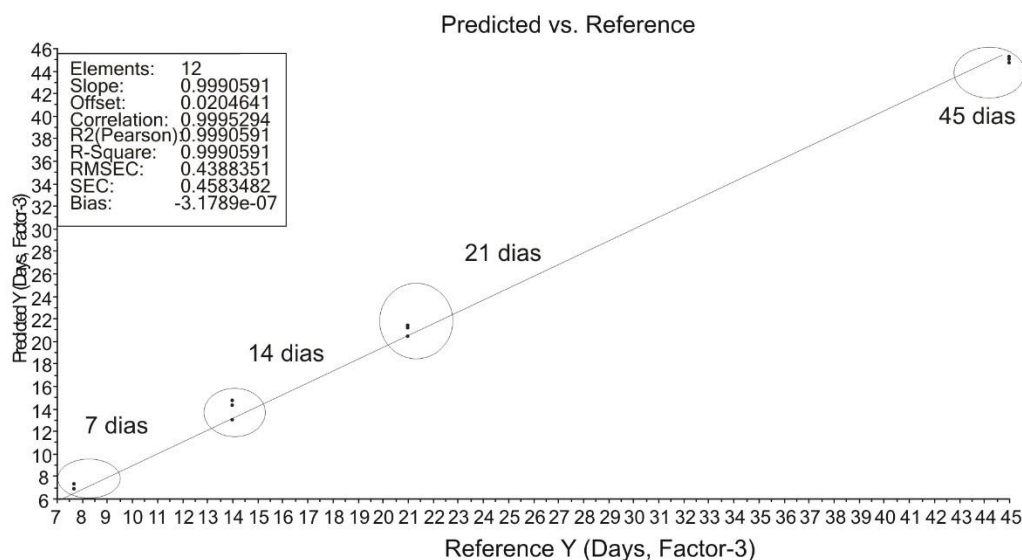
APÊNDICE 14. CURVA DA REGRESSÃO PLS ENTRE O 7º E O 45º DIA DE MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* KUNTH FEITA NO TRATAMENTO COM SACAROSE



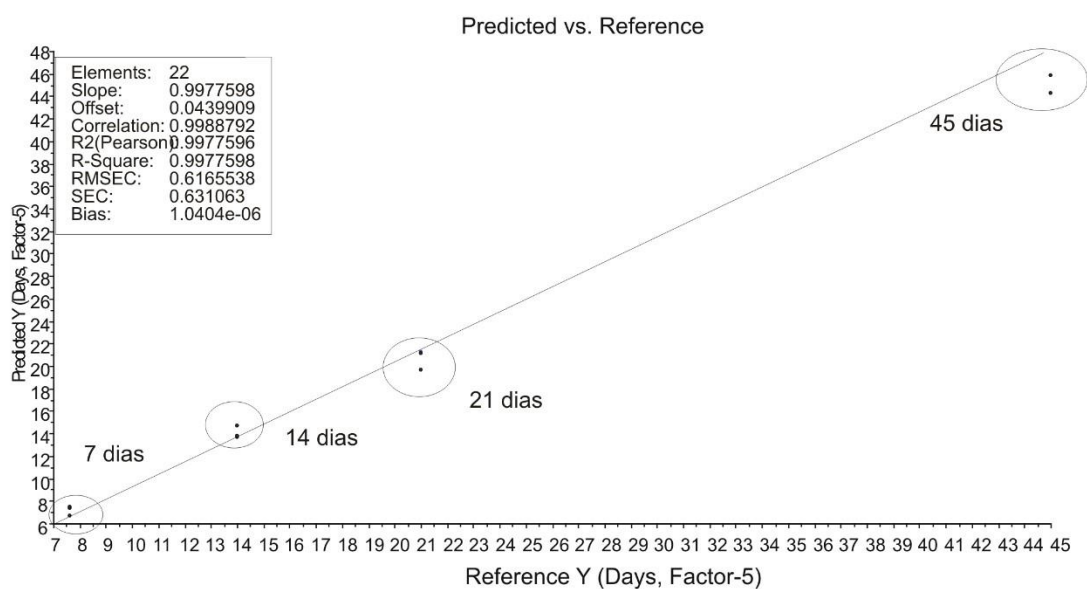
APÊNDICE 15 CURVA DA REGRESSÃO PLS ENTRE O 7º E O 45º DIA DE MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* KUNTH FEITA NO TRATAMENTO COM GLICOSE



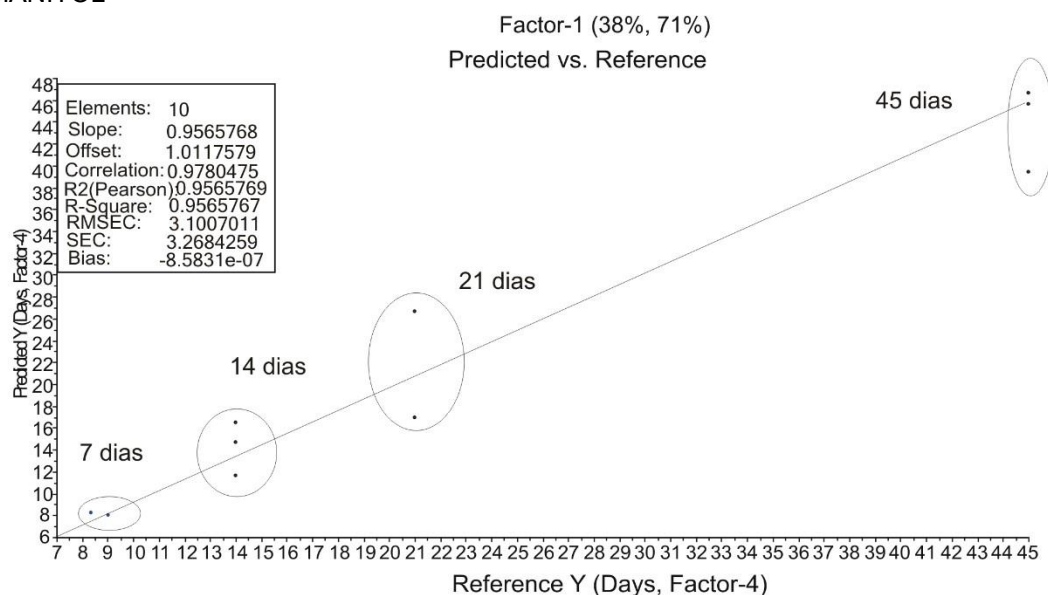
APÊNDICE 16. CURVA DA REGRESSÃO PLS ENTRE O 7º E O 45º DIA DE MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* KUNTH FEITA NO TRATAMENTO COM POLIETILENOGLICOL



APÊNDICE 17 CURVA DA REGRESSÃO PLS ENTRE O 7º E O 45º DIA DE MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* KUNTH FEITA NO TRATAMENTO COM SORBITOL



APÊNDICE 18. CURVA DA REGRESSÃO PLS ENTRE O 7º E O 45º DIA DE MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Bactris gasipaes* KUNTH FEITA NO TRATAMENTO COM MANITOL



APÊNDICE 19 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE FOLHAS DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Tratamentos	2	9508.80000	4754.40000	21.2915	**
Resíduo	12	2679.60000	223.30000		

Total 14 12188.40000

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
2	12	6.9266	21.2915	<.0001
MG = 67.80000		CV% = 22.04		

APÊNDICE 20 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Resíduo	12	1864.40000	155.36667	
Total	14	4026.93333		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
2	12	6.9266	6.9595	0.0098
MG = 41.26667		= 30.21		

APÊNDICE 21– ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TAMANHO DE FOLHAS DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	6.63782	3.31891	5.7690 *
Resíduo	12	6.90359	0.57530	
Total	14	13.54141		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
2	12	3.8853	5.769	0.0175

MG = 2.45007 CV% = 30.96

APÊNDICE 22 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TAMANHO DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	0.27258	0.13629	2.8477 ns
Resíduo	12	0.57432	0.04786	
Total	14	0.84690		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
2	12	3.8853	2.8477	0.0973

MG = 0.64574 CV% = 33.88

APÊNDICE 23 ANÁLISE ESTATÍSTICA MASA FRESCA DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	0.96904	0.48452	5.6458 *
Resíduo	12	1.02984	0.08582	
Total	14	1.99888		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
2	12	3.8853	5.6458	0.0187

MG = 0.90319 CV% = 22.44

APÊNDICE 24 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA MASSA SECA DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	26.27313	13.13657	5.6457 *
Resíduo	12	27.92196	2.32683	
Total	14	54.19509		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
2	12	3.8853	5.6457	0.0187
MG = 3.58240		CV% = 22.58		

APÊNDICE 25 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE NITROGÊNIO DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	966.02233	483.01116	125.4007 **
Resíduo	6	23.11045		3.85174
Total	8	989.13278		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
2	6	10.9248	125.4007	<.0001
MG = 54.87964		CV% = 3.58		

APÊNDICE 26 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE CÁLCIO DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	1.42522	0.71261	6.9372 *
Resíduo	6	0.61634	0.10272	
Total	8	2.04156		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
2	6	5.1433	6.9372	0.0275
MG = 2.03097		CV% = 15.78		

APÊNDICE 27 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE COBRE DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	3.13628	1.56814	20.1054 **
Resíduo	6	0.46798	0.07800	
Total	8	3.60425		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
2	6	10.9248	20.1054	0.0021
MG = 1.83240		CV% = 15.24		

APÊNDICE 28 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE FERRO DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	0.02877	0.01439	1.1491 ns
Resíduo	6	0.07512	0.01252	
Total	8	0.10389		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
2	6	5.1433	1.1491	0.378
MG = 0.38458		CV% = 29.09		

APÊNDICE 29 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE POTÁSSIO DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	585.61620	292.80810	35.2196 **
Resíduo	6	49.88264	8.31377	
Total	8	635.49884		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
2	6	10.9248	35.2196	0.0004
MG = 52.54458		CV% = 5.49		

APÊNDICE 30 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE MAGNÉSIO DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	0.21955	0.10977	9.2996 *
Resíduo	6	0.07082	0.01180	
Total	8	0.29037		
** significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) * significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )				
GL	GLR	F-crit	F	p
2	6	5.1433	9.2996	0.0145
MG = 0.96428		CV% = 11.27		

APÊNDICE 31 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE MANGANÊS DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	0.00282	0.00141	10.4381 *
Resíduo	6	0.00081	0.00014	
Total	8	0.00363		
** significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) * significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )				
GL	GLR	F-crit	F	p
2	6	5.1433	10.4381	0.0111
MG = 0.06674		CV% = 17.41		

APÊNDICE 32 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE FÓSFORO DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	14.00523	7.00262	18.4536 **
Resíduo	6	2.27682	0.37947	
Total	8	16.28206		
** significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) * significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )				
GL	GLR	F-crit	F	p
2	6	10.9248	18.4536	0.0027
MG = 6.04946		CV% = 10.18		



APÊNDICE 33 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CONTEÚDO DE ZINCO DE PLÂNTULAS DE *Bactris gasipaes* CULTIVADAS EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	0.00342	0.00171	28.9595 **
Resíduo	6	0.00035	0.00006	
Total	8	0.00378		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ) ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
2	6	10.9248	28.9595	0.0007
MG = 0.08166		CV% = 9.42		